

Université de Montréal

**Rôle de l'axe CD40/CD40L dans la Régulation
de la Fonction Plaquettaire**

Par

Daniel Yacoub

Département des Sciences Biomédicales

Université de Montréal

Faculté de médecine

**Thèse présentée à la faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Biomédicales**

Novembre 2010

© Daniel Yacoub

Université de Montréal

**Cette thèse intitulée :
Rôle de l'Axe CD40/CD40L dans la Régulation
de la Fonction Plaquettaire**

**Présentée Par
Daniel Yacoub**

a été évaluée par :

Dr Guy Rousseau.....	Président rapporteur
Dr Yahye Merhi.....	Directeur de recherche
Dr Walid Mourad.....	Codirecteur de recherche
Dr Hung Ly.....	Membre du Jury
Dr Jean Sévigny.....	Examineur externe
Dre Chantal Pharand.....	Représentante du doyen

Résumé

Le CD40 ligand (CD40L) est une molécule inflammatoire appartenant à la famille du Facteur de Nécrose Tumorale ("Tumor Necrosis Factor", TNF), originalement identifié au niveau des cellules immunitaires. L'interaction du CD40L avec son récepteur de haute affinité présent sur les cellules B, le CD40, est d'une importance cruciale à la production d'immunoglobulines lors de la réponse immunitaire. Aujourd'hui, nous savons que ces deux molécules qui constituent l'axe CD40/CD40L sont aussi exprimées au niveau des cellules du système vasculaire et occupent une place importante dans une variété de réactions inflammatoires, de sorte que le CD40L est présentement reconnu comme une molécule thrombo-inflammatoire prédictive des événements cardiovasculaires. Les plaquettes sont la principale source du CD40L soluble ("soluble CD40L", sCD40L) plasmatique et il fut démontré être impliqué dans l'activation plaquettaire, malgré que son impact exact sur la fonction plaquettaire et les mécanismes sous-jacents demeurent inconnus. Ainsi, le but de ce projet était de déterminer l'impact du sCD40L sur la fonction plaquettaire et d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. Les objectifs spécifiques étaient : 1) d'évaluer l'impact du sCD40L sur l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*; 2) de déterminer le récepteur cible (CD40 ou autre) impliqué dans ces effets; 3) de décortiquer les voies signalétiques intracellulaires et moléculaires induites par le sCD40L, impliquant la participation potentielle de la famille du facteur associé du récepteur du TNF ("Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor", TRAF) et 4) d'analyser l'effet du sCD40L sur la formation du thrombus *in vivo*.

Le sCD40L augmente fortement l'activation et l'agrégation plaquettaire induite par de faibles doses d'agonistes. Les plaquettes humaines traitées avec une forme mutante du sCD40L qui n'interagit pas avec le CD40 et les plaquettes de souris CD40 déficientes (CD40^{-/-}) ne furent pas en mesure d'induire ces effets. De plus, nous démontrons la présence de plusieurs membres de la famille des TRAFs dans les plaquettes, parmi lesquels seulement TRAF-2 interagit avec le CD40 suite à la stimulation par le sCD40L. Le sCD40L agit sur les plaquettes au repos par l'entremise de la protéine Rac1 et de sa cible en aval, soit la protéine kinase activatrice du mitogène p38 ("Mitogen Activating Protein Kinase", MAPK). Ceci mène ultimement au changement de forme plaquettaire et à la polymérisation de l'actine. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les souris CD40^{-/-} démontrent un défaut significatif de l'agrégation plaquettaire en

réponse au collagène, ce qui souligne l'importance du CD40 dans les interactions plaquettes-plaquettes. Dans un deuxième temps, le sCD40L amplifie l'agrégation plaquettaire en sang complet, accélère les temps de thrombose *in vitro* mesurés à l'aide du système PFA-100 et augmente l'adhésion plaquettaire au collagène sous condition de flux, le tout par l'entremise du CD40. Finalement, dans un modèle de thrombose artérielle murin, l'infusion du sCD40L exacerbe la formation du thrombus chez les souris du type sauvage ("Wild Type", WT), mais non chez les souris CD40^{-/-}. Ceci fut en plus associé à une augmentation significative du nombre de leucocytes au sein du thrombus des souris WT traitées à l'aide du sCD40L, tel que démontré par marquage immuno-histologique anti-CD45 et par quantification des coupes artérielles par microscopie optique.

En résumé, ce projet identifie une nouvelle voie signalétique, TRAF-2/Rac1/p38 MAPK, en réponse au sCD40L et démontre ses effets sur l'activation et l'agrégation plaquettaire. De manière encore plus importante, nous démontrons pour la première fois la présence d'une corrélation positive entre les niveaux circulants du sCD40L et la thrombose artérielle, tout en soulignant l'importance du CD40 dans ce processus. Ainsi, le sCD40L constitue un activateur important des plaquettes, les prédisposant à une thrombose exacerbée en réponse au dommage vasculaire. Ces résultats peuvent expliquer le lien étroit qui existe entre les niveaux circulants du sCD40L et l'incidence des maladies cardiovasculaires.

Mots clés: plaquettes ■ thrombose ■ voies signalétiques ■ CD40L

Abstract

CD40 ligand (CD40L) is an inflammatory molecule of the tumor necrosis factor (TNF) superfamily originally identified on cells of the immune system. Interaction of CD40L with its respective receptor on B cells, CD40, is of critical importance for immunoglobulin isotype switching during the immune response. Today, we know that these two molecules are also present on cells of the vascular system and have important implications in various inflammatory reactions, such that CD40L is now regarded as a thrombo-inflammatory molecule that predicts cardiovascular events. Platelets constitute the major source of soluble CD40L (sCD40L) found in plasma and it has been shown in return to influence platelet activation, albeit the exact functional impact and underlying mechanisms remain undefined. Hence, this project was designed to investigate the effects of sCD40L on platelet function and to elucidate the cellular and molecular mechanisms involved. The specific aims of this study are four fold: 1) evaluate the impact of sCD40L on platelet activation and aggregation *in vitro*; 2) determine through which receptor (CD40 or other) these responses are mediated; 3) elucidate the underlying intracellular signalling pathways and molecular mechanisms involved, including the potential participation of the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor (TRAF) family and 4) assess the impact of sCD40L on thrombus formation *in vivo*.

sCD40L strongly enhances activation and aggregation of washed human platelets induced by sub-threshold concentrations of agonists. Human platelets treated with a mutated form of sCD40L that does not bind CD40 and CD40 deficient (CD40^{-/-}) mouse platelets failed to elicit such responses. Furthermore, we found that platelets express multiple members of the TRAF family, among which only TRAF-2 associates with CD40 upon sCD40L stimulation. Noticeably, sCD40L primes resting platelets through activation of the small GTPase Rac1 and its downstream target p38 mitogen activating protein kinase (MAPK), which leads to platelet shape change and actin polymerization. Interestingly, CD40^{-/-} mice exhibit impaired platelet aggregation in response to collagen, thus highlighting the importance of CD40 in platelet-platelet interactions. Moreover, sCD40L dose-dependently enhances whole blood platelet aggregation and accelerates platelet function analyzer (PFA)-100 closure times in a CD40-dependant fashion. Preincubation of whole blood with sCD40L significantly increases platelet adhesion to collagen in an *ex-vivo* perfusion system under flow. In addition, in a ferric chloride-induced murine

arterial thrombosis model, infusion of sCD40L exacerbates thrombus formation in wild type (WT), but not in CD40^{-/-} mice. This was further associated with increased leukocyte infiltration within the thrombus mass of WT mice treated with sCD40L.

In this project, we identify a new TRAF-2/Rac1/p38 MAPK signaling pathway in response to sCD40L and its effects on platelet activation and aggregation. More importantly, we establish a direct positive correlation between levels of sCD40L and thrombus formation *in vivo*, while highlighting the requirement of CD40 in this process. Thus, sCD40L is an important platelet primer predisposing platelets to enhanced thrombus formation in response to vascular injury. These results may explain the link between circulating levels of sCD40L and the occurrence of cardiovascular diseases.

Key Words: platelets ■ thrombosis ■ signal transduction ■ CD40L

Table des matières

Identification du Jury.....	i
Résumé.....	ii-iii
Abstract.....	iv-v
Table des matières.....	vi-viii
Liste des figures.....	ix-xi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii-xv
Remerciements.....	xvi
 Chapitre 1 : L'axe CD40/CD40L	 1-42
1.1 Introduction.....	2
1.2 L'axe CD40/CD40L.....	3-8
1.2.1 Structure du CD40L.....	3-4
1.2.2 Structure du CD40.....	4-5
1.2.3 Interaction CD40L/CD40.....	5-6
1.2.4 Autres récepteurs du CD40L.....	7-8
1.3 Expression et fonction cellulaire de l'axe CD40/CD40L.....	8-14
1.3.1 Lymphocytes B.....	8-9
1.3.2 Lymphocytes T.....	10
1.3.3 Monocytes/Macrophages.....	10-11
1.3.4 Plaquettes.....	11-12
1.3.5 Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.....	12-13
1.3.6 Cellules dendritiques.....	13
1.3.7 Neutrophiles.....	14
1.4 Signalisation intracellulaire induite par le CD40.....	14-20
1.4.1 Structure des TRAFs.....	15-16
1.4.2 TRAF1.....	16
1.4.3 TRAF2.....	16-18
1.4.4 TRAF3.....	18
1.4.5 TRAF4.....	19
1.4.6 TRAF5.....	19
1.4.7 TRAF6.....	19-20
1.4.8 JAK3.....	20
1.5 Implications physiologiques fonctionnelles de l'axe CD40/CD40L.....	20-26

1.5.1	Immunité humorale.....	20-23
1.5.2	Immunité cellulaire.....	23-24
1.5.3	Apoptose cellulaire.....	24-26
1.6	Implications pathologiques de l'axe CD40/CD40L.....	26-42
1.6.1	L'athérosclérose.....	26-30
1.6.1.1	Initiation de la plaque.....	27-28
1.6.1.2	Progression de la plaque.....	28-29
1.6.1.3	Stabilité de la plaque et thrombose.....	29-30
1.6.2	Le cancer.....	30-33
1.6.2.1	Production de cellules immunocompétentes anti-tumorales.....	32
1.6.2.2	Apoptose tumorale.....	32-33
1.6.2.3	Augmentation d'antigènes immunitaires anti-tumoraux.....	33
1.6.3	Les maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques.....	34-41
1.6.3.1	Mécanismes d'action.....	34-35
1.6.3.2	La thyroïdite.....	35-36
1.6.3.3	Le diabète de type I.....	36-37
1.6.3.4	La sclérose en plaques.....	37-38
1.6.3.5	Les maladies inflammatoires de l'intestin.....	38
1.6.3.6	L'arthrite rhumatoïde.....	38-39
1.6.3.7	Le lupus érythémateux disséminé.....	40-41
1.6.4	Le CD40L soluble et les syndromes cardiovasculaires cliniques.....	41-42
Chapitre 2 : Les plaquettes.....		43-68
2.1	Origine et structure des plaquettes.....	44-46
2.2	Molécules d'adhésion plaquettaire.....	47-53
2.2.1	La GPVI.....	47-48
2.2.2	L'intégrine $\alpha_2\beta_1$	48-49
2.2.3	La GPIb/IX/V.....	49-50
2.2.4	L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	50-51
2.2.5	La P-sélectine.....	51-53
2.3	Fonction plaquettaire.....	53-63
2.3.1	Adhésion plaquettaire.....	54-56
2.3.2	Activation plaquettaire.....	56-58
2.3.3	Sécrétion plaquettaire.....	58-60
2.3.4	Agrégation plaquettaire et stabilité de l'agrégat.....	60-63
2.4	Rôle des plaquettes dans la pathologie.....	63-68
2.4.1	Athérosclérose.....	64-66
2.4.2	Le cancer.....	66-67

2.4.3 Accident vasculaire cérébrale (AVC).....	67-68
Chapitre 3 : Rôle de l'axe CD40/CD40L dans la fonction plaquettaire	69-74
3.1 L'axe CD40/CD40L plaquettaire.....	70-71
3.1.1 Structure et activation du CD40L plaquettaire.....	70-71
3.1.2 Structure et activation du CD40 plaquettaire.....	71
3.2 Rôle de l'axe CD40/CD40L plaquettaire.....	72-74
3.2.1 Rôle du CD40L plaquettaire dans l'activation de l'endothélium.....	72-73
3.2.2 Rôle du CD40L plaquettaire dans la stabilisation du thrombus.....	73
3.2.3 Rôle du CD40 plaquettaire dans l'activation et la sécrétion des plaquettes	74
Hypothèse et objectifs	75
Chapitre 4 : Contribution scientifique	76-133
Mise en contexte pour le premier article.....	77
Contribution des auteurs.....	78
Premier article :	79-110
CD40L Primes Platelets and Enhances Agonist-Induced Platelet Activation and Aggregation through a CD40-Dependant TRAF-2/Rac1/p38 MAPK Signaling Pathway	
Mise en contexte pour le deuxième article.....	111
Contribution des auteurs.....	112
Deuxième article :	113-133
Enhanced Levels of Soluble CD40L Exacerbate Thrombus Formation and Leukocyte Infiltration in a CD40-Dependant Manner	
Discussion	134-143
Conclusions et directions futures	144-146
Bibliographie	147-178
Publications	179-180

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 :	Structure du gène et de la protéine du CD40L humain.....	4
Figure 1.2 :	Structure du gène et de la protéine du CD40 humain.....	5
Figure 1.3 :	Les deux modèles d'interactions possibles entre le CD40L et le CD40....	6
Figure 1.4 :	Rôle du complexe CD40/CD40L au niveau des lymphocytes B et dans la production d'anticorps lors de la réponse immunitaire	9
Figure 1.5 :	Les différentes voies de signalisation induites par le CD40.....	15
Figure 1.6 :	Structure des TRAFs.....	16
Figure 1.7 :	Illustration de la double fonction de TRAF2 dans la régulation de NF- κ B.....	18
Figure 1.8 :	Rôle du complexe CD40/CD40L lors de l'immunité humorale.....	22
Figure 1.9 :	Les mécanismes signalétiques impliqués dans les effets apoptotiques et anti-apoptotiques induits par l'activation du CD40.....	25
Figure 1.10 :	Rôle de l'axe CD40/CD40L dans l'athérosclérose.....	28
Figure 1.11 :	Mécanismes d'actions potentiels par lesquels le complexe CD40/CD40L contribue aux maladies auto-immunes.....	34

Chapitre 2

Figure 2.1 :	Les trois modèles proposés pour la production de plaquettes à partir des mégacaryocytes.....	45
Figure 2.2 :	Structure du cytosquelette plaquettaire.....	46
Figure 2.3 :	Structure de la GPVI.....	48
Figure 2.4 :	Structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	51
Figure 2.5 :	La famille des sélectines.....	53
Figure 2.6 :	Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale.....	56

Figure 2.7 :	Images par microscopie électronique à balayage du changement de forme plaquettaire.....	57
Figure 2.8 :	Les principales voies signalétiques impliquées dans l'activation plaquettaire.....	58
Figure 2.9 :	Mécanismes de la signalisation plaquettaire " <i>outside-in</i> " de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	62
Figure 2.10 :	Rôle des plaquettes dans la formation de la plaque athérosclérotique.....	65

Chapitre 3

Figure 3.1 :	Activation et clivage enzymatique du CD40L suite à l'activation plaquettaire.....	71
Figure 3.2 :	Rôle du CD40L plaquettaire dans l'activation des cellules endothéliales.....	73

Article # 1

Figure 1 :	Le sCD40L augmente l'activation et l'agrégation plaquettaire par l'entremise du CD40.....	100
Figure 2 :	Le sCD40L induit l'association de TRAF-2 au CD40.....	101
Figure 3 :	Le sCD40L induit le changement de forme plaquettaire et la polymérisation de l'actine.....	102
Figure 4 :	La petite GTPase Rac1 est essentielle à la signalisation induite par le sCD40L.....	103
Figure 5 :	La p38 MAPK est une cible signalétique importante de Rac1 en réponse au sCD40L.....	104
Figure 6 :	Les souris CD40 ^{-/-} démontrent des défauts importants d'agrégation et de changement de forme plaquettaire.....	105
Figure S1 :	Effet du sCD40L sur la sécrétion des granules denses.....	106
Figure S2 :	Effet du sCD40L sur l'activation et l'agrégation plaquettaire en présence de fortes doses de collagène.....	107
Figure S3 :	Effet du sCD40L ^{R/Y} et sCD40L ^{WT} sur la liaison du CD40 et de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$	108
Figure S4 :	Effet du sCD40L sur la mobilisation du calcium intracellulaire.....	109

Figure S5 :	Effet du SB203580 sur la phosphorylation de la p38 MAPK en réponse au sCD40L.....	110
-------------	---	-----

Article # 2

Figure 1 :	Le sCD40L amplifie l'agrégation plaquettaire en sang complet et accélère les temps de thrombose <i>in vitro</i>	129
Figure 2 :	Le sCD40L augmente l'adhésion plaquettaire au collagène en condition de flux.....	130
Figure 3 :	Le sCD40L exacerbe la formation du thrombus <i>in vivo</i>	131
Figure 4 :	Représentation histologique des coupes artérielles post-thrombose.....	132
Figure 5 :	Le sCD40L augmente l'infiltration leucocytaire au sein du thrombus.....	133

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 : Expression de l'axe CD40/CD40L au niveau des cellules du système vasculaire.....	8
Tableau 1.2 : Rôle de l'axe CD40/CD40L dans l'immunité cellulaire.....	24
Tableau 1.3 : Le CD40L soluble dans les syndromes coronariens aigus et stables.....	42

Chapitre 2

Tableau 2.1 : Principaux constituants des granules plaquettaires.....	59
---	----

Abréviations

ACS :	Syndromes Coronariens Aigus (" <i>Acute Coronary Syndromes</i> ")
ADAM-10 :	La Déintégrine Et Metallopeptidase-10 (" <i>A Disintegrin And Metallopeptidase-10</i> ")
ADP :	Adénosine Diphosphate (" <i>Adenosine Diphosphate</i> ")
AIP3 :	Protéine Inductible-3 Alpha (" <i>Alpha-Induced Protein 3</i> ")
APC :	Cellule Présentatrice de l'Antigène (" <i>Antigen Presenting Cell</i> ")
APRIL :	Ligand Inductible à Prolifération (" <i>A Proliferation Inducing Ligand</i> ")
AVC :	Accident Vasculaire Cérébral
BLyS :	protéine Stimulatrice des Lymphocytes B (" <i>B Lymphocyte Stimulator protein</i> ")
Bcl :	cellule B lymphome (" <i>B cell lymphoma</i> ")
bFGF:	Facteur de Croissance basique des Fibroblastes (" <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> ")
CD40L:	CD40 Ligand
cIAP1:	Inhibiteurs cellulaires de l'Apoptose 1 (" <i>cellular Inhibitors of Apoptosis 1</i> ")
COX :	Cyclooxygénase (" <i>Cyclooxygenase</i> ")
DAG :	Diacylglycérol (" <i>Diacylglycerol</i> ")
EAE :	Encéphalopathie Auto-immun Expérimental (" <i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i> ")
EGF :	Facteur de Croissance Epidermique (" <i>Epidermal Growth Factor</i> ")
HIGM:	Syndrome Hyper-IgM couplé au chromosome X (" <i>X-linked Immunodeficiency Hyper IgM-syndrome</i> ")
ICAM-1:	Molécule-1 d'Adhésion Intercellulaire (" <i>InterCellular Adhesion Molecule-1</i> ")
IP ₃ :	Inositol Triphosphate (" <i>Triphosphate Inositol</i> ")
ITAM :	Motifs Activateurs d'Immunorécepteurs à base de tyrosine (" <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motifs</i> ")

JAK3 :	Janus Kinase 3 (" <i>Janus Kinase 3</i> ")
LDL :	Lipoprotéine de Faible Densité (" <i>Low Density Lipoprotein</i> ")
LFA-1:	Antigène-1 associée à la Fonction Lymphocytaire (" <i>Lymphocyte Function-associated Antigen-1</i> ")
MAPK :	Protéine Kinase Activatrice du Mitogène (" <i>Mitogen Activating Protein Kinase</i> ")
MCP-1:	Protéine-1 Chémoattractante des Monocytes (" <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> ")
MEKK1 :	protéine Kinase Kinase 1 du Mitogène activée (" <i>Mitogen-activated protein Kinase Kinase 1</i> ")
MHC:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité (" <i>Major Histocompatibility Complex</i> ")
MIP-1 α :	Protéine-1 α Inflammatoire des Macrophages (" <i>Macrophage Inflammatory Protein-1α</i> ")
MMP:	Métalloprotéinases de la Matrice (" <i>Matrix Metalloproteinases</i> ")
NF- κ B :	Facteur Nucléaire- κ B (" <i>Nuclear Factor-κB</i> ")
NIK:	Protéine Kinase Inductrice du NF- κ B (" <i>NF-κB Inducing Kinase</i> ")
NK :	Tueuse Naturelle (" <i>Natural Killer</i> ")
NO:	Monoxyde d'Azote (" <i>Nitric Oxyde</i> ")
NOD :	Diabétique Non Obèse (" <i>Non-Obese Diabetic</i> ")
NSF :	Facteur Sensible au N-ethylmaleimide (" <i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i> ")
PKC :	Protéine Kinase C (" <i>Protein Kinase C</i> ")
PLC γ :	Phospholipase C γ (" <i>Phospholipase Cγ</i> ")
PSGL-1 :	Ligand-1 Glycoprotéique de la P-sélectine (" <i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i> ")
RANK :	Récepteur Activateur du NF- κ B (" <i>Receptor Activator for NF-κB</i> ")
RANTES:	Régulé dans l'Activation des cellules T Normales Exprimées et Sécrétées (" <i>Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted</i> ")

ROS:	Dérivés Réactifs de l'Oxygène (" <i>Reactive Oxygen Species</i> ")
sCD40L:	CD40L soluble (" <i>soluble CD40L</i> ")
SNAP :	Protéine Soluble Associée au NSF (" <i>Soluble NSF-Associated Protein</i> ")
SNARE :	Récepteurs du SNAP (" <i>SNAP Receptors</i> ")
TNF:	Facteur de Nécrose Tumorale (" <i>Tumor Necrosis Factor</i> ")
TAP :	Transporteur Peptidique de l'Antigène (" <i>Antigen Peptide Transporter-1</i> ")
TRAF :	Facteur Associé du Récepteur du TNF (" <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor</i> ")
TxA ₂ :	Thromboxane A ₂ (" <i>Thromboxane A₂</i> ")
VCAM-1:	Molécule-1 d'Adhésion de Cellule Vasculaire (" <i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> ")
VEGF:	Facteur de Croissance Vasculaire Endothélial (" <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ")
vWF :	Facteur von Willebrand (" <i>von Willebrand Factor</i> ")
WT :	Type Sauvage (" <i>Wild Type</i> ")

Remerciements

Je voudrais saluer le Dr Yahye Merhi, mon directeur de recherche, auquel je dois un merci particulier pour son support et son encadrement incondtionnel. Merci Yahye, ta passion pour la recherche, ton professionnalisme et ton éthique de travail font de toi un chercheur dévoué et une personne exceptionnelle.

J'aimerais aussi remercier mon collègue de travail M. Ahmed Hachem, avec qui j'ai collaboré étroitement dans la planification et l'exécution des expériences qui entourent ce projet. Merci Ahmed, ce projet fut un succès, en grande partie, grâce à toi. Ton travail méticuleux et ta capacité intellectuelle sont des atouts qui t'aideront sans doute dans la poursuite de tes projets futurs.

Mes remerciements vont aussi à mon collègue de travail, le Dr Jean-François Théorêt, avec qui je travaille depuis près de six ans. Merci pour tes commentaires pertinents et ta participation dans ce projet. Un grand merci à M^{lle} Lara Bou Khzam et M. Younes Zaid pour leur support amical et leur humour quotidien. Bonne chance à vous deux dans la continuation de vos doctorats.

Finalement, je remercie vivement le personnel de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal : chercheurs et chercheuses, associé(e)s, assistant(e)s, infirmier(e)s, et technicien(ne)s de recherche et mes camarades étudiant(e)s, pour toute l'aide qu'il (elle)s m'ont apportée dans la réalisation de ce projet.

À vous tous et toutes, un grand Merci!

Chapitre 1

L'axe CD40/CD40L

1.1 Introduction

L'inflammation est perçue aujourd'hui comme une composante clé à la base d'une multitude de complications vasculaires, tels que l'athérosclérose, les syndromes coronariens aigus ("*Acute Coronary Syndromes*", ACS) et le diabète. La relation étroite qui existe entre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires est principalement témoignée par deux constatations importantes. Tout d'abord, l'athérosclérose, la principale cause des syndromes vasculaires, est reconnue comme une maladie inflammatoire chronique caractérisée par une multitude d'interactions complexes entre les leucocytes, la paroi vasculaire et les plaquettes. Par ailleurs, les marqueurs inflammatoires prédictifs des événements cardiovasculaires, telles que la protéine C-réactive et l'IL-6, ont maintenant une fiabilité comparable à ceux du cholestérol (cholestérol total et cholestérol de haute densité lipoprotéique).

À ce jour, plusieurs médiateurs inflammatoires potentiellement impliqués dans le développement et la progression de ces maladies furent identifiés, en particulier le complexe CD40/CD40L auquel on accorde une attention de plus en plus importante. Originellement découvert en 1985 chez les lymphocyte B pour son implication dans l'immunité humorale et la production d'anticorps,^{1, 2} l'axe CD40/CD40L est à ce jour reconnu comme un joueur prédéterminant, non seulement de la réponse immunitaire, mais aussi de l'inflammation vasculaire, étant donné son expression quasi ubiquitaire au niveau des cellules du système cardiovasculaire, tels que les lymphocytes B et T, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules dendritiques et même les plaquettes.^{3, 4} L'athérosclérose, aujourd'hui identifiée comme une maladie inflammatoire chronique, est sans doute la complication vasculaire auquel le CD40/CD40L attire la plus grande attention. En effet, plusieurs modèles expérimentaux, tant *in vitro* qu'*in vivo*, ont démontré l'importance de cet axe dans toutes les facettes de l'athérosclérose,⁵ de par son implication dans l'augmentation des molécules d'adhésion et la production de cytokines et chemokines pro-inflammatoires, de métalloprotéinases de la matrice ("*Matrix Metalloproteinases*", MMP), de facteurs de croissance et de facteurs pro-coagulants.⁶⁻⁸ D'autre part, le complexe CD40/CD40L semble aussi jouer un rôle significatif dans plusieurs complications auto-immunes, tels que l'arthrite chronique, le diabète et la sclérose en plaque, ainsi que dans le cancer et les maladies neuro-dégénératives.⁹

L'importance accrue du CD40/CD40L dans les maladies vasculaires est témoignée par la relation étroite qui existe entre les niveaux circulants du sCD40L chez les patients et l'apparition

de plusieurs syndromes cliniques importants, tels que les ACS et les syndromes coronariens stables, le diabète et l'hypercholestérolémie.¹⁰⁻¹³ En effet, plusieurs études cliniques ont démontré cette corrélation positive, de sorte que le sCD40L est maintenant considéré comme un marqueur clinique important qui pourra sans doute être employé dans le futur comme outil diagnostique et préventif dans le traitement des maladies vasculaires.

1.2 L'axe CD40/CD40L

La première observation témoignant de l'importance fondamentale de l'axe CD40/CD40L dans l'immunité provint de patients souffrants du syndrome hyper-IgM couplé au chromosome X ("*X-linked immunodeficiency hyper IgM-syndrome*" HIGM), chez lesquels une mutation génétique au niveau du gène du CD40L cause une anormalité sévère de la réponse immunitaire humorale et la production d'anticorps (IgG, IgA et IgE),¹⁴ lié à un défaut d'interaction entre le CD40L et le CD40. Par la suite, la découverte de l'expression quasi ubiquitaire du complexe CD40/CD40L au niveau du système vasculaire et l'élucidation des diverses fonctions de cet axe dans une multitude de phénomènes physiopathologiques à composante inflammatoire, changèrent dramatiquement la perception du CD40/CD40L comme un simple régulateur de l'immunité.

1.2.1 Structure du CD40L

Le CD40L (CD154) est une protéine transmembranaire du type II de 39-kDa appartenant à la famille du TNF.^{15, 16} Le gène codant du CD40L est situé dans la région q26.3-27.1 du chromosome X, un fragment d'une longueur de 13 kb.¹⁷ Ce dernier consiste principalement de 5 exons, dont l'exon I code pour la région intracellulaire et transmembranaire du CD40L, tandis que les exons II-V codent pour la région extracellulaire de la molécule (Figure 1.1).

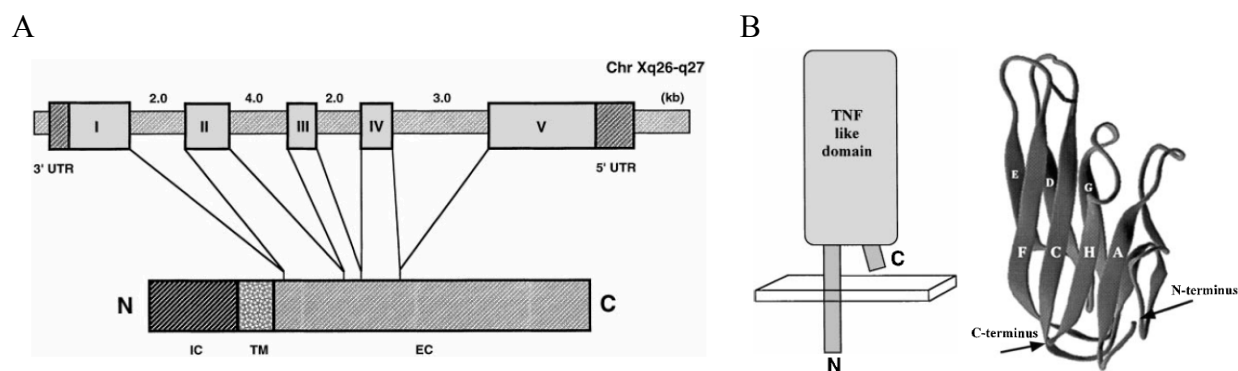


Figure 1.1 : Structure du gène et de la protéine du CD40L humain. A) Le gène qui code pour le CD40L contient 5 exons codants pour les différentes régions de la protéine (IC= intracellulaire; TM= transmembranaire; EC=extracellulaire) B) Structure schématisée (gauche) et cristallographique (droite) de la protéine du CD40L (monomère). La région extracellulaire de la molécule comprend le domaine C-terminal, tandis que le domaine N-terminal se retrouve dans la région intracellulaire. Cette organisation est typique des protéines appartenant à la famille du TNF. Van Kooten C. et al. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 67: 2-17.

La protéine du CD40L est constituée de 261 acides aminés et comprend un domaine C-terminal situé dans la région extracellulaire et un domaine N-terminal dans la région intracellulaire de la molécule.¹⁸ Malgré que le CD40L soit une protéine de type II transmembranaire, elle semble former un complexe multimérique composé de trois monomères (trimère) associés au niveau de la membrane cellulaire.¹⁹ Cette structure faciliterait son interaction avec le CD40, possiblement aussi un trimère, afin de permettre l'induction de signaux intracellulaires. Outre la forme membranaire, il existe aussi une forme soluble du CD40L (sCD40L) en circulation dans le sang. Cette forme provient presque exclusivement d'un clivage enzymatique au niveau de la membrane des plaquettes suite à leur activation et demeure un trimère fonctionnel de 18 kDa.²⁰ Le sCD40L est d'ailleurs la forme la plus employée en recherche, de par sa fonctionnalité intacte et la corrélation étroite qui existe entre ses niveaux plasmatiques et l'apparition de plusieurs syndromes cliniques vasculaires.

1.2.2 Structure du CD40

CD40, le récepteur de haute affinité du CD40L, est une protéine transmembranaire de type I de 48-kDa appartenant à la famille des récepteurs du TNF.²¹ Le gène du CD40 se retrouve dans la région q12.13.2 du chromosome 20 et comprend 9 exons d'une longueur totale de 16.3 kb.²² L'exon I code pour la séquence promotrice de la protéine, les exons II-VI pour le domaine extracellulaire, l'exon VII pour le domaine transmembranaire et les exons VIII et IX codent pour le domaine intracellulaire du CD40. La protéine finale contient au total 255 acides aminés, dont

la majorité (171 acides aminés) forme la région extracellulaire de la molécule.²³ Contrairement au CD40L, le domaine C-terminal du CD40 est situé dans la région intracellulaire et le domaine N-terminal se retrouve du côté extracellulaire. La région extracellulaire du CD40 est principalement constituée d'une séquence répétitive riche en résidus cystéines (20 au total), divisée en quatre domaines comprenant chacun un arrangement de deux sous domaines parmi un total de quatre (A1, A2, B1 et B2) (Figure 1.2). Cet arrangement est typique des protéines faisant partie de la famille des récepteurs du TNF.

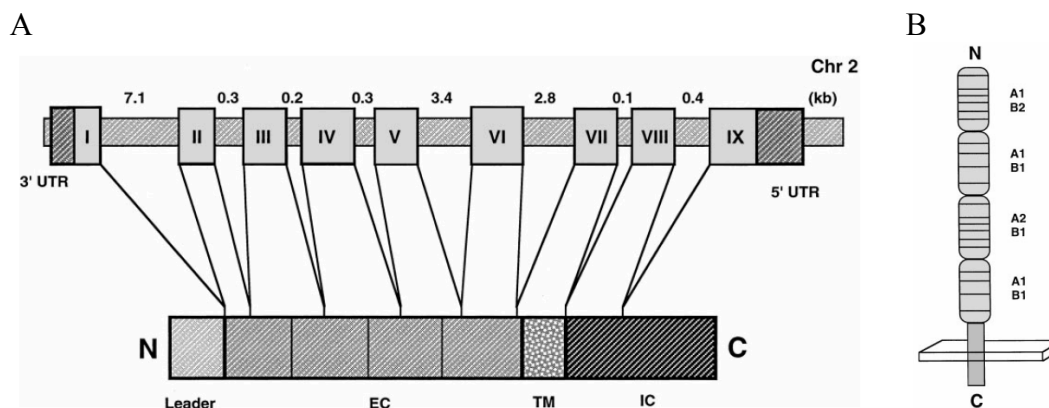


Figure 1.2 : Structure du gène et de la protéine du CD40 humain. A) Le gène du CD40 contient 9 exons codant pour les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire de la protéine (Leader= séquence promotrice; EC=extracellulaire; TM=transmembranaire; IC=intracellulaire). B) La protéine du CD40 est principalement constituée d'un long domaine extracellulaire contenant une séquence de 20 résidus cystéines (lignes horizontales) divisée en quatre domaines comprenant chacun deux sous-domaines. Van Kooten C. et al. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000; 67: 2-17.

Une certaine ambiguïté quant à l'arrangement exacte de multimère de CD40 présent à la surface membranaire existe toujours. Certains investigateurs ont rapporté la présence de dimères de CD40,²⁴ tandis que d'autres semblent favoriser un assemblage de trois molécules de CD40 (trimère) constitutivement exprimées à la membrane.²⁵ Cette dernière possibilité demeure la plus plausible, étant donné la structure trimérique de son ligand, le CD40L. Par contre, selon certains, la formation de trimère de CD40 ne serait observable que suite à la liaison du CD40L (cet aspect sera discuté plus en détails dans la prochaine section).

1.2.3 Interaction CD40L/CD40

Les résidus impliqués dans l'interaction du CD40L avec le CD40 sont bien documentés, dont les plus importants incluent les résidus à charges basiques K143, R203 et R207 du CD40L et les

résidus à charges acides D84, E114 et E117 du CD40.^{26, 27} Cette interaction polaire entre ces deux groupes de résidus est entourée d'un mur de résidus hydrophobiques, ce qui stabilise en plus l'interaction entre les deux protéines.

Il existe à ce jour deux modèles d'interaction possible entre le CD40L et le CD40. Cette incertitude provient en grande partie du doute qui existe quant à la structure membranaire du CD40. Tel que mentionné auparavant, le CD40 est soit un complexe formé de trois molécules (trimère) constitutivement associées au niveau de la membrane, ou simplement un assemblage de trois molécules individuelles (monomères), non associées, ayant la capacité de se trimériser suite à la liaison du CD40L. Ainsi, le premier modèle d'interaction voudrait que le CD40L (toujours trimérique) favorise la formation d'un complexe homotrimérique de CD40 suite à son interaction avec celui-ci (Figure 1.3A). Cet assemblage permettrait par la suite l'association de protéines adaptatrices cytoplasmiques et l'induction de signaux intracellulaires. Par ailleurs, dans le deuxième modèle d'interaction, le CD40 se retrouve déjà sous forme d'un trimère au niveau de la membrane, ce qui augmenterait son affinité stœchiométrique pour le CD40L, aussi un trimère (Figure 1.3B). Cette dernière hypothèse d'interaction est présentement la plus acceptée dans la littérature, puisqu'elle semble être soutenue par un plus grand nombre de données expérimentales. Certes, la donnée la plus convaincante en faveur de cette dernière provient d'une élégante étude démontrant que tous les récepteurs associés à la famille du TNF, incluant le CD40, se retrouvent sous forme de trimères pré-assemblés au niveau de la membrane plasmique,²⁵ contrairement à la pensée originale supportant une oligomérisation du récepteur suite à la liaison du CD40L.

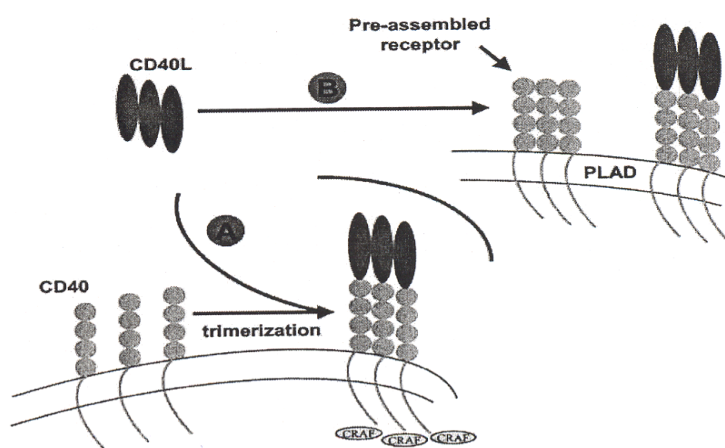


Figure 1.3 : Les deux modèles d'interactions possibles entre le CD40L et le CD40. Anand SX. et al. *Thromb Haemost.* 2003; 90:377-84.

1.2.4 Autres récepteurs du CD40L

Le CD40 fut, pour longtemps, considéré comme le seul récepteur pour le CD40L. Cependant, au cours des quelques dernières années, trois autres récepteurs du CD40L furent identifiés, soit les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$, Mac-1 et $\alpha_5\beta_1$. Malgré que le CD40 demeure le principal récepteur de haute affinité du CD40L, ces nouveaux partenaires semblent occuper une fonction bien particulière dans différentes conditions physiopathologiques.

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ fut identifiée comme un récepteur du CD40L à la surface des plaquettes et l'interaction entre ces deux derniers semble favoriser l'activation plaquettaire, ainsi que la stabilisation du thrombus plaquettaire *in vivo*.^{28, 29} L'interaction CD40L/ $\alpha_{IIb}\beta_3$ est possible grâce au domaine KGD du CD40L. La plupart des récepteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, incluant le fibrinogène, possèdent au moins un domaine KGD et l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ contient un domaine de reconnaissance pour ce motif, permettant ainsi leur interaction.

Mac-1, la principale intégrine impliquée dans l'adhésion ferme des neutrophiles et monocytes à l'endothélium activé au cours de l'inflammation, est aussi un récepteur pour le CD40L. Cette interaction favorise l'adhésion et la transmigration des leucocytes au niveau de la plaque athérosclérotique et est donc impliquée dans la formation néointimale, une composante clé de l'athérosclérose.³⁰ Les résidus exacts impliqués dans cette interaction sont encore inconnus, mais il semble que le CD40L n'interagit avec Mac-1 que dans sa conformation active.

Finalement, l'intégrine $\alpha_5\beta_1$, le principal récepteur de la fibronectine, fut récemment identifiée comme un autre récepteur du CD40L.³¹ Les résultats de cette étude ont démontré que le sCD40L se lie aux cellules de la lignée monocyttaire U937 et induit leur activation indépendamment des récepteurs CD40 et $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ces effets biologiques semblent dépendre à priori de l'interaction CD40L/ $\alpha_5\beta_1$, puisque le blocage spécifique de l' $\alpha_5\beta_1$ renverse l'activation de ces cellules en présence du sCD40L.

Il est intéressant de noter que certaines cellules expriment plus d'un de ces récepteurs et il s'avère possible que le CD40L interagit simultanément avec deux ou trois de ceux-ci. Ce phénomène n'est évidemment possible que si les résidus impliqués dans l'interaction du CD40L avec un premier récepteur sont différents de ceux impliqués dans l'interaction avec un deuxième. Par exemple, il fut démontré que la liaison du sCD40L au CD40 des cellules BJAB, une lignée lymphocytaire B négative pour l' $\alpha_5\beta_1$, n'est pas inhibée par une forme soluble de l' $\alpha_5\beta_1$, ce qui indique que le CD40L est en mesure de lier simultanément ces deux récepteurs.³¹ La participation

et la fonction exactes des différents récepteurs du CD40L dans les diverses conditions physiopathologiques à composante inflammatoire commencent tout juste à être explorées.

1.3 Expression et fonction cellulaire de l'axe CD40/CD40L

Tel que mentionné plus haut, l'axe CD40/CD40L fut originalement découvert sur les cellules impliquées dans l'immunité, tels que les lymphocytes B et T.^{15, 16} Par contre, nous savons aujourd'hui que ce complexe est présent au niveau de la grande majorité des cellules du système vasculaire et qu'il possède une fonction importante dans l'inflammation, en plus de son rôle crucial dans les réactions immunitaires. Le tableau 1.1 résume l'expression du CD40 et du CD40L au niveau des diverses cellules du système vasculaire.

Tableau 1.1 : Expression de l'axe CD40/CD40L au niveau des cellules du système vasculaire

Type Cellulaire	CD40		CD40L		Forme du CD40L
	Au repos	Activée	Au repos	Activée	
Lymphocytes B	+++	+++	++	+++	Membranaire
Lymphocytes T	-	+++	-	+++	Membranaire, soluble
Monocytes/Macrophages	+	+++	+	+++	Membranaire
Plaquettes	++	+++	-	+++	Membranaire, soluble
Cellules Endothéliales	+	+++	+	+	Membranaire
Cellules Musculaire Lisse	+++	ND	+	ND	Membranaire
Cellules Dendritiques	-	+++	+	+	Membranaire
Neutrophiles	+	+++	+	+	Membranaire

Légende : -, non-exprimé; +, faiblement exprimé; ++, moyennement exprimé; +++, fortement exprimé; ND, non documenté

1.3.1 Lymphocytes B

Le rôle du complexe CD40/CD40L au niveau des lymphocytes B est crucial à la réponse immunitaire humorale. Les lymphocytes B expriment de manière constitutive le CD40 et ce dernier interagit avec le CD40L des lymphocytes T activées en présence d'antigènes lors d'une infection quelconque. Cette interaction, en présence de cytokines relâchées par les lymphocytes T (IL-4, IL-2 et IL-10), induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en

plasmocytes, cellules productrices d'anticorps (Figure 1.4).³² L'interaction CD40/CD40L semble à elle seule suffisante afin d'induire la production des anticorps IgA et IgG, tandis qu'une co-stimulation en présence de l'IL-4, en particulier, est nécessaire pour la production des anticorps IgE.^{33, 34} En absence de l'interaction CD40/CD40L, les cellules B ne produisent que les anticorps IgM, tel qu'observé chez les patients souffrants du syndrome HIGM.¹⁴ De plus, au niveau des lymphocytes B, l'interaction CD40/CD40L induit la relâche des cytokines IL-6, IL-10 et TNF- α ,³⁵⁻³⁷ l'augmentation de la molécule-1 d'adhésion intercellulaire ("InterCellular Adhesion Molecule-1", ICAM-1), l'antigène-1 associée à la fonction lymphocytaire ("Lymphocyte Function-associated Antigen-1", LFA-1) et la molécule-1 d'adhésion de cellule vasculaire ("Vascular Cell Adhesion Molecule-1", VCAM-1),³⁸⁻⁴⁰ ainsi que l'augmentation des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité-1 et -2 ("Major Histocompatibility Complex-1 and -2", MHC-I, et MHC-II),^{41, 42} le tout facilitant la prolifération et la différenciation de ces cellules en cellules plasmiques.

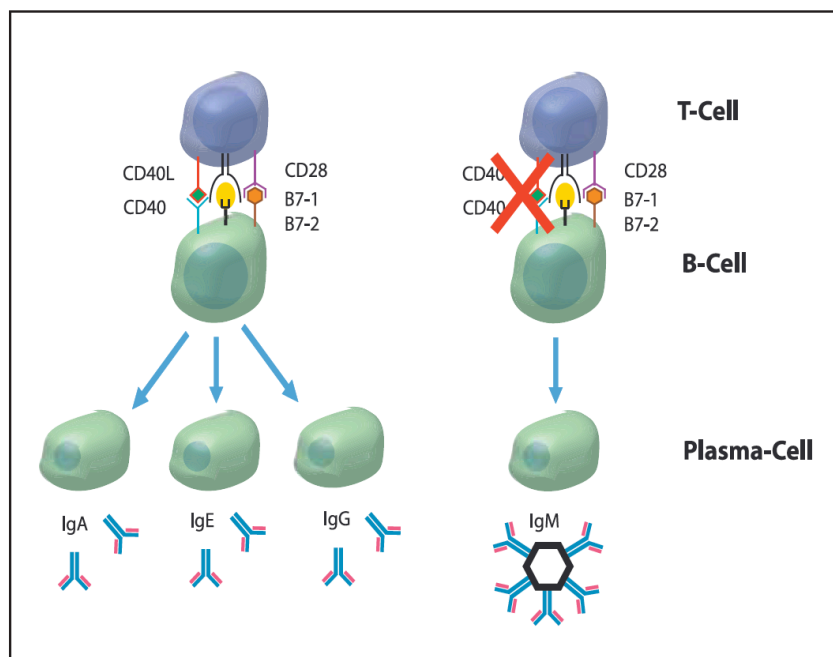


Figure 1.4 : Rôle du complexe CD40/CD40L au niveau des lymphocytes B et dans la production d'anticorps lors de la réponse immunitaire. Lievens D. et al. *Thromb Haemost.* 2009; 102:206-214.

Les lymphocytes B expriment aussi le CD40L qui semble être impliqué dans une boucle de rétroaction positive, puisqu'il peut à son tour interagir avec le CD40 d'une autre cellule B, facilitant ainsi l'activation et la différenciation des lymphocytes B.^{43, 44} Le CD40 des cellules B serait de plus impliqué dans la différenciation de ces cellules en cellules B mémoires.^{45, 46}

1.3.2 Lymphocytes T

Les lymphocytes T requièrent la présence de deux principaux signaux afin d'induire leur activation complète. Le premier signal provient de l'interaction du récepteur T (TCR) avec les molécules peptidiques du MHC sur la cellule présentatrice de l'antigène ("Antigen Presenting Cell", APC). Le deuxième signal provient de l'interaction entre des molécules qu'on appelle co-stimulatrices, soit principalement le complexe CD28/B7 et l'axe CD40/CD40L.⁵ Ce signal co-stimulateur est essentiel à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules T.⁴⁷⁻⁵⁰ Le premier signal induit l'expression du CD40L au niveau de la membrane des lymphocytes T et celui-ci interagit par la suite avec le CD40 sur les cellules APCs, telles que les cellules B, les macrophages ou les cellules dendritiques. Cette interaction bidirectionnelle amplifie l'activation des lymphocytes T et favorise leur prolifération et différenciation en cellule T effectrices (matures),⁵⁰ en plus d'induire la différenciation des cellules avec lesquelles elles interagissent (par exemple les lymphocytes B, figure 1.4). Suite à l'activation des lymphocytes T, le CD40L membranaire est clivé en sCD40L par la déintégrine et métallopeptidase-10 ("A Disintegrin And Metallopeptidase-10", ADAM-10).⁵¹ Par contre, le sCD40L provenant des lymphocytes T ne compte que pour environ 5% de la forme totale du sCD40L en circulation;⁵ la grande majorité provient plutôt des plaquettes.

Les lymphocytes T activés expriment aussi le CD40, mais son implication exacte dans la fonction de ces cellules demeure mal caractérisée. Par contre, il semble que le CD40 soit impliqué dans l'interaction des lymphocytes T CD8+ avec les cellules CD4+. L'interaction du CD40 des cellules CD8+ avec le CD40L des cellules CD4+ permettrait la différenciation des lymphocytes CD8+ en cellules mémoires, comme pour les lymphocytes B.⁵²

1.3.3 Monocytes/Macrophages

Le rôle du complexe CD40/CD40L dans la fonction des monocytes est bien documenté. Les monocytes expriment constitutivement le CD40 et, en tant qu'APC, elles sont en mesure d'interagir avec le CD40L des lymphocytes T.^{4, 53} Cette interaction est bidirectionnelle, de sorte que les monocytes favorisent l'activation des cellules T qui, à leur tour, induisent l'activation et la différenciation des monocytes en macrophages. La liaison du CD40L des lymphocytes T au CD40 des monocytes et macrophages engendre principalement la relâche de plusieurs cytokines (IL-12, IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α)⁵⁴⁻⁵⁸ et MMPs (MMP-1 MMP-2, MMP-3 et MMP-9),^{59, 60}

l'augmentation de molécules co-stimulatrices (ICAM-1, LFA-3, B7-1 et B7-2),⁵⁶ ainsi que la sécrétion du facteur tissulaire et du monoxyde d'azote ("Nitric Oxyde", NO).⁵⁹ Ces effets biologiques sont essentiels à la fonction immunitaire/inflammatoire et angiogénique de ces cellules.

La plupart des effets biologiques du CD40L sur les monocytes sont attribuables à son interaction avec le CD40, malgré que d'autres récepteurs présents à la surface de ces cellules soient en mesure d'induire différentes réponses cellulaires, en particulier Mac-1. En effet, il fut récemment démontré que l'interaction CD40L/Mac-1 favorise l'adhésion et la migration des monocytes à l'endothélium, ainsi que la relâche de myéloperoxydases, au cours de la réponse inflammatoire.⁶¹

L'activation des monocytes augmente l'expression membranaire du CD40, ainsi que celle du CD40L. La fonction précise du CD40L est inconnue dans ces cellules, mais il semble qu'il pourrait possiblement être impliqué dans les interactions monocytes/monocytes via le CD40. Cette interaction amplifierait l'activation et la différenciation des monocytes en augmentant leur fonction sécrétrice.⁶²

1.3.4 Plaquettes

Les plaquettes occupent une place fondamentale dans l'hémostase, mais participent aussi activement aux réactions inflammatoires, de par leur répertoire impressionnant en cytokines inflammatoires, facteurs de croissance et MMPs. Les plaquettes au repos expriment constitutivement le CD40, tandis que le CD40L n'est présent au niveau de la membrane que suite à l'activation cellulaire.³ L'implication exacte du complexe CD40/CD40L dans la fonction plaquettaire sera discutée en détail dans le troisième chapitre et nous ne ferons ici qu'un bref survol.

La première étude témoignant de l'importance du complexe CD40/CD40L dans la fonction plaquettaire provint de Heen et al.³ Ces derniers démontrèrent que le CD40L des plaquettes activées est en mesure d'interagir avec le CD40 des cellules endothéliales et des monocytes, afin d'induire une réaction inflammatoire importante au niveau de ces cellules. En particulier, cette interaction augmente l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, favorise la relâche des cytokines de la protéine-1 chémoattractante des monocytes ("Monocyte Chemoattractant Protein-1", MCP-1), de l'IL6, et de l'IL-8, et induit la production de

la MMP-9. Par ailleurs, il fut aussi démontré que le sCD40L plaquettaire est impliqué dans la stabilisation du thrombus par l'entremise de son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²⁸ Peu d'information existe quant au rôle du CD40 plaquettaire, mais il semble que la stimulation des plaquettes par le sCD40L induit la relâche de la protéine régulée dans l'activation des cellules T normales exprimées et sécrétées ("Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted", RANTES) et la production de dérivés réactifs de l'oxygène ("Reactive Oxygen Species", ROS).^{63, 64}

1.3.5 Cellules endothéliales et cellules musculaires lisses

L'axe CD40/CD40L occupe une place prédéterminante dans l'activation des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. Les cellules endothéliales expriment le CD40 et le CD40L, mais leur activation cellulaire semble provenir en grande partie de l'activation du CD40, suite à l'adhésion des cellules immunocompétentes (monocytes, lymphocytes et neutrophiles) et des plaquettes à l'endothélium activé. L'activation du CD40 sur les cellules endothéliales contribue significativement à leur rôle inflammatoire.⁶ En particulier, cette liaison induit l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, et engendre la relâche des cytokines IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, de la protéine-1 α inflammatoire des macrophages ("Macrophage Inflammatory Protein-1 α ", MIP-1 α) et RANTES, le tout favorisant le recrutement des monocytes et lymphocytes aux sites inflammatoires.⁶⁵⁻⁶⁸

Les cellules endothéliales participent activement aux mécanismes de l'angiogénèse et l'axe CD40/CD40L semble de plus occuper une place importante dans ce phénomène. Premièrement, l'activation des cellules endothéliales par le CD40L favorise la synthèse et la sécrétion des MMP-9, MMP-2 et MMP-1 impliquées dans la digestion de la matrice extracellulaire, une étape fondamentale de l'angiogénèse.⁷ Par ailleurs, l'activation du CD40 déclenche la sécrétion du facteur de croissance vasculaire endothélial ("Vascular Endothelial Growth Factor", VEGF) par les cellules endothéliales qui est essentiel à l'initiation et la progression des mécanismes de l'angiogénèse.⁶⁹ De plus, la liaison du CD40 sur les cellules endothéliales, favorise l'expression de la cyclooxygénase-2 ("Cyclooxygenase-2", COX-2), qui possède une activité pro-angiogénique via l'induction du facteur de croissance basique des fibroblastes ("basic fibroblast growth factor", bFGF).⁷⁰

Finalement, le complexe CD40/CD40L est impliqué dans la fonction pro-coagulante des cellules endothéliales. En effet, il fut démontré que la liaison du CD40 via le CD40L, induit la synthèse et la relâche du facteur tissulaire par les cellules endothéliales,⁶⁸ ce qui déclenche l'activation de la cascade de coagulation ainsi que l'activation des plaquettes.

Le rôle de l'axe CD40/CD40L au niveau des cellules musculaires lisses est moins documenté, mais il semble que le CD40L est en mesure de déclencher l'activation de voies signalétiques impliquées dans l'activité mitogénique de ces cellules, en particulier la voie des tyrosines kinases Src, ce qui mène à la sécrétion des cytokines MCP-1 et IL-8.^{71, 72} De plus, l'activation du CD40 sur les cellules musculaires lisses engendre la dégradation du collagène de la matrice interstitielle via les MMPs, ce qui favoriserait la prolifération et la migration de ces cellules.^{73, 74}

1.3.6 Cellules dendritiques

La cellule dendritique est la cellule APC par excellence et, pour cette raison, elle occupe une place centrale dans le système immunitaire. L'interaction CD40/CD40L au niveau des cellules dendritiques agit principalement comme élément co-stimulateur favorisant l'activation des lymphocytes T. L'activation des cellules dendritiques, tel qu'observée en présence de pathogène, engendre une augmentation significative du CD40 membranaire. Ce dernier est par la suite en mesure d'interagir avec le CD40L des lymphocytes T activés, ce qui augmente l'expression des molécules co-stimulatrices B7-1/B7-2 et CD80/CD86, et favorise la relâche de l'IL-12 par les cellules dendritiques.^{53, 75} Ces réponses cellulaires sont intimement impliquées dans la différenciation des lymphocytes T vers une réponse immunitaire Th1.^{76, 77}

Les cellules dendritiques expriment aussi le CD40L, mais en petite quantité, comparativement au CD40. Malgré que la fonction exacte du CD40L des cellules dendritiques reste à vérifier, il semble qu'il soit impliqué dans des interactions bidirectionnelles entre les cellules dendritiques et les lymphocytes B. En effet, le CD40L des cellules dendritiques, via son interaction avec le CD40 des lymphocytes B, favoriserait l'activation et la différenciation de ces derniers en cellules plasmiques productrices d'anticorps.⁷⁸⁻⁸⁰ La fonction du CD40L des cellules dendritiques demeure néanmoins ambiguë et certes moins significative que celle du CD40.

1.3.7 Neutrophiles

Les neutrophiles sont parmi les premières cellules vasculaires recrutées aux sites inflammatoires et elles participent activement aux mécanismes immunitaires de l'organisme. Les neutrophiles activés expriment le CD40 et il semble occuper un rôle important dans les interactions plaquettes/neutrophiles. Il fut démontré par Vanichakarn et al.⁸¹ que les plaquettes sont en mesure d'activer les neutrophiles, par l'entremise du sCD40L qu'elles relâchent suite à leur stimulation. Le sCD40L induit la sécrétion de ROS au niveau des neutrophiles qui, à son tour, favorise réciproquement l'activation des plaquettes. Par ailleurs, les résultats de l'étude de Li et al.³⁰ ont rapporté que l'interaction des neutrophiles avec les plaquettes augmente l'expression de Mac-1 et que des niveaux élevés de sCD40L favorise la formation d'agrégats plaquettes/neutrophiles, ainsi que la formation néointimale suite au dommage vasculaire.

1.4 Signalisation intracellulaire induite par le CD40

Les différentes réponses cellulaires induites par l'interaction CD40/CD40L sont reliées à l'activation de voies de signalisation intracellulaire spécifiques. Le CD40 constitue le principal récepteur signalétique et très peu d'information existe quant aux voies de signalisation déclenchées suite à son activation par le CD40L. La liaison du CD40 par le CD40L engendre le recrutement de protéines adaptatrices, nommées TRAF, à la queue cytoplasmique de la molécule du CD40.⁸² La relocalisation cellulaire des TRAFs et leur interaction avec le CD40 déclenchent l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont les principales comprennent la voie du facteur nucléaire- κ B ("Nuclear Factor- κ B", NF- κ B), la voie des MAPKs (p38, Akt et JNK), la voie de la PI3 kinase et la voie de la phospholipase C γ ("Phospholipase C γ ", PLC γ).^{83, 84} Toute signalisation intracellulaire induite par le CD40 dépend presque exclusivement des TRAFs, mais il semble aussi exister des voies signalétiques indépendantes des TRAFs, telle que la voie de la STAT5 qui découle de l'association directe de la janus kinase 3 ("Janus Kinase 3", JAK3) au CD40.^{85, 86} La figure 1.5 résume les principales voies de signalisation qui découlent de l'activation du CD40 ainsi que la fonction des différents membres de la famille des TRAFs dans l'activation des différentes voies signalétiques déclenchées.

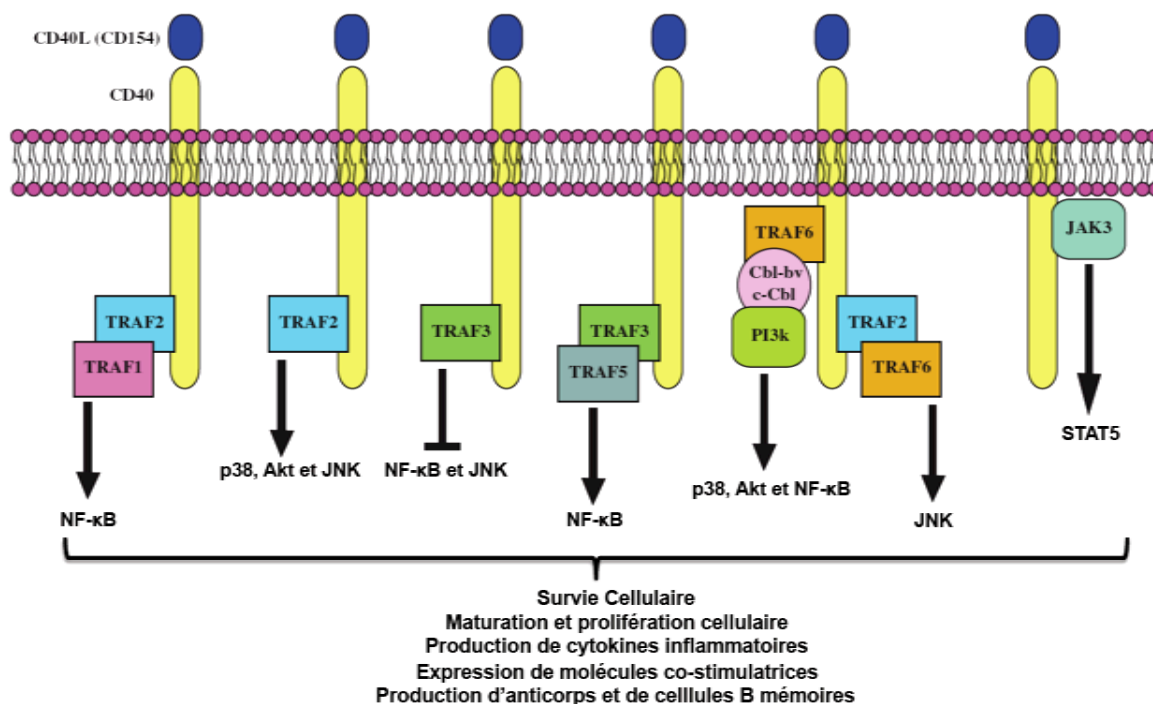


Figure 1.5 : Les différentes voies de signalisation induites par le CD40. Chaque membre de la famille des TRAFs possède une fonction distincte, mais aussi parfois chevauchante. La grande majorité des voies de signalisation qui découlent de l'activation du CD40 dépendent des TRAFs, mais il existe aussi des voies indépendantes, telle que la voie de STAT5. Adapté de Elgueta R. et al. *Immunological Reviews*. 2009; 229:152-172.

1.4.1 Structure des TRAFs

La famille des TRAFs comprend six membres, désignés TRAF1 à TRAF6. Les TRAFs sont constitués d'un domaine C-terminal carboxylé, nommé TRAF-C, d'un domaine riche en leucine-zipper, TRAF-N, et de deux domaines riches en motifs zinc, nommés Zinc fingers et zinc Ring, à l'exception de TRAF-1 qui est dépourvu des deux domaines zinc (Figure 1.6).⁸⁷ Le domaine TRAF-C est impliqué dans la liaison des TRAFs au CD40, tandis que le domaine TRAF-N est responsable des interactions homo- et hétéro-trimérique entre les TRAFs (interaction TRAF2/TRAF3 par exemple). Les domaines riches en motifs zinc seraient impliqués dans le recrutement de protéines signalétiques additionnelles, telles que les kinases et les facteurs transcriptionnelles.⁸⁸ Suite à la liaison du CD40L au CD40, les TRAFs sont directement, ou indirectement à l'aide d'autres membres, recrutés à la queue cytoplasmique de la molécule du CD40. La séquence protéique impliquée dans l'interaction des TRAFs avec le CD40 est différente d'un membre à un autre et il n'existe donc aucune séquence consensus responsable de cette interaction, malgré qu'on retrouve parfois des séquences de chevauchement entre certains membres, tels que TRAF2 et TRAF3.^{89, 90}

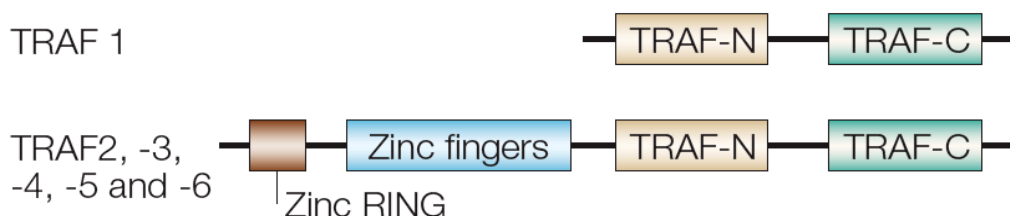


Figure 1.6 : Structure des TRAFs. Bishop G. et al. *Nature Reviews Immunology*. 2004; 4:775-786.

1.4.2 TRAF1

Suite à l'activation du CD40, l'expression protéique de TRAF1 est significativement augmentée.^{91, 92} Puisque que TRAF1 ne possède aucun domaine riche en motif zinc, il semble qu'il soit impliqué dans la régulation signalétique des autres membres des TRAFs.⁸² Le site de liaison de TRAF1 au CD40 est chevauché par celui de TRAF2 et TRAF3 et il semble que TRAF1 n'est en mesure que d'interagir faiblement avec CD40, en l'absence de la participation de TRAF2.⁹³ Au niveau des APCs et des lymphocytes B, la déficience en TRAF1 entraîne une diminution du recrutement de TRAF2 au CD40, ainsi qu'une augmentation de la dégradation enzymatique du récepteur.^{94, 95} De plus, il semble que le recrutement de TRAF1 ainsi que de TRAF2 est nécessaire à l'activation complète de la voie NF- κ B, étant donné que la double délétion génétique de ces deux membres engendre une plus forte atténuation de l'activation de NF- κ B, comparativement à la délétion individuelle du gène de l'un ou de l'autre de ces membres.⁹⁵ Bref, ces résultats suggèrent que TRAF1 régule le recrutement et la dégradation de TRAF2 et que ces deux membres coopèrent ensemble dans l'activation de la voie de la NF- κ B.

1.4.3 TRAF2

TRAF2 est parmi un des membres les plus étudiés et son rôle principal réside dans l'activation des MAPKs p38, Akt, JNK, ainsi que ERK1/2. Ces résultats furent démontrés dans les cellules B et les fibroblastes de l'embryon de souris déficientes en TRAF2, chez lesquels l'activation de ces voies signalétiques était significativement inhibée suite à la liaison du CD40L au CD40.⁹⁶⁻⁹⁸ De plus, TRAF2 induit le recrutement de la protéine kinase kinase 1 du mitogène activée ("Mitogen-activated protein Kinase Kinase 1", MEKK1) à la queue cytoplasmique du CD40, une étape essentielle à l'activation des protéines ERK1/2 et à l'activation de la voie p38 et JNK suite à la stimulation par le CD40L.⁹⁹

Au niveau des lymphocytes B, TRAF2 semble aussi participer à l'activation de la voie NF- κ B, en collaboration avec TRAF6. Par contre, l'interaction de l'un ou de l'autre avec le CD40 semble suffisant afin d'induire l'activation de NF- κ B. Ceci fut confirmé par des résultats démontrant que la déficience de soit TRAF2 ou TRAF6 n'engendre pas d'anormalité au niveau de l'activation de NF- κ B, mais que la double délétion de ces deux membres induit une inhibition sévère de cette voie.^{98, 100, 101} L'activation de NF- κ B dans les cellules B est impliquée dans leur activation et différenciation en cellules plasmatiques.^{84, 102}

Malgré son rôle important dans l'activation des voies de signalisations induites par le CD40, TRAF2 semble aussi posséder une fonction de régulation négative.¹⁰³ Son implication en tant que régulateur négatif de la signalisation par le CD40 provient de son interaction constitutive avec TRAF3 (Figure 1.7). En absence de stimulation par le CD40L, un complexe protéique est constitutivement formé entre les inhibiteurs cellulaires de l'apoptose 1 et 2 ("cellular Inhibitors of Apoptosis 1 and 2", cIAP1 et cIAP2), TRAF2, TRAF3, et la protéine kinase inductrice du NF- κ B ("NF- κ B Inducing Kinase", NIK). L'interaction TRAF2/TRAF3 permet aux protéines cIAP1 et cIAP2 de dégrader la protéine NIK, ce qui inhibe l'activation de la voie NF- κ B et favorise l'apoptose cellulaire.^{104, 105} D'ailleurs, l'ablation de TRAF2 engendre une accumulation de NIK dans les cellules B.¹⁰⁶ Suite à la stimulation par le CD40L, ce complexe protéique est destabilisé et TRAF2 et TRAF3 sont recrutés vers le CD40, ce qui permet à TRAF2 d'activer NF- κ B. Une fois à la membrane, s'ensuit une dégradation de TRAF2 (auto dégradation) et TRAF3 (via cIAP1/2), libérant ainsi NIK et lui permettant d'activer NF- κ B.^{82, 105, 107} Bref, cIAP1/2 occupent une double fonction, soit celle de la dégradation de NIK en condition basale et celle de la dégradation de TRAF3 suite à la liaison du CD40L. Parallèlement, TRAF2 occupe aussi une double fonction, soit celle de son rôle inhibiteur de l'activation de NF- κ B via son interaction avec TRAF3, et celle de son rôle activateur de NF- κ B suite à son interaction avec le CD40 et sa subséquente dégradation.

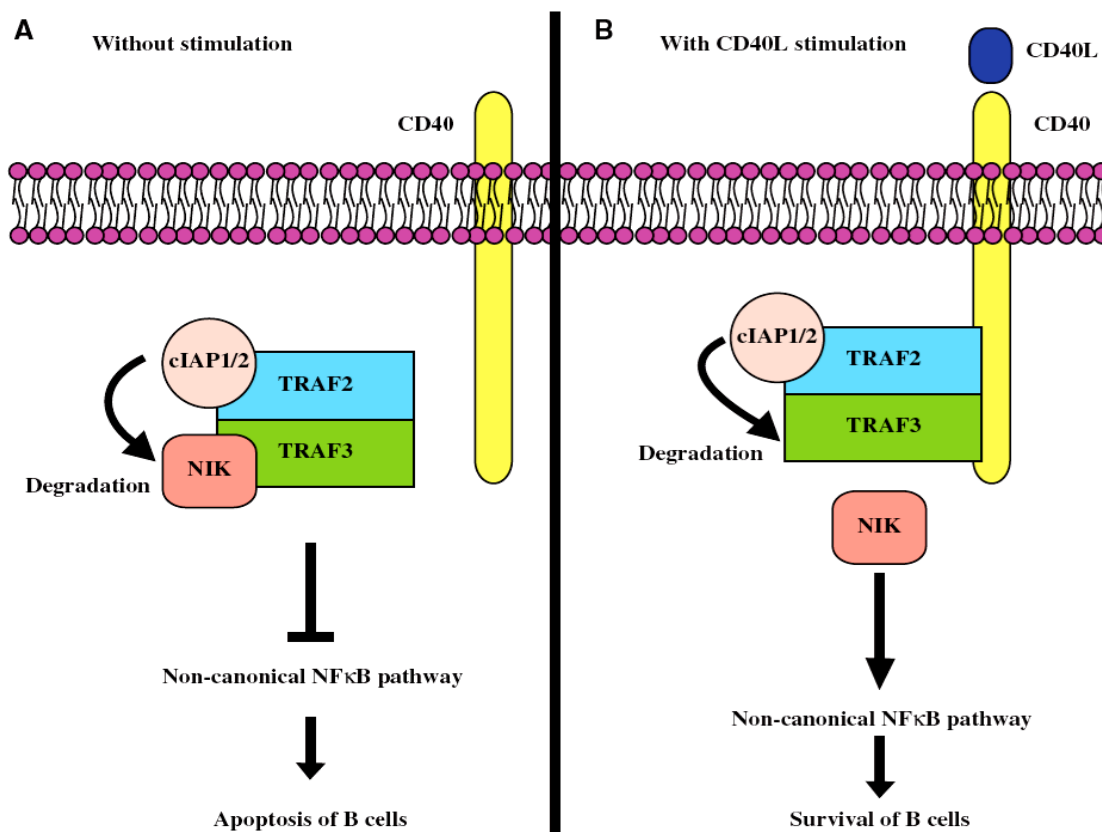


Figure 1.7 : Illustration de la double fonction de TRAF2 dans la régulation de NF-κB. Elgueta R. et al. *Immunological Reviews*. 2009; 229:152-172.

1.4.4 TRAF3

Tel que discuté plus haut, TRAF3 semble occuper un rôle inhibiteur dans la signalisation par le CD40.¹⁰⁸ Son implication inhibitrice est supportée par des expériences démontrant que l'ablation de la protéine dans les cellules B augmente l'activation de NF-κB et de JNK suite à la stimulation par le CD40L.^{108, 109} De plus, les souris déficientes en TRAF3 démontrent une accumulation intracellulaire de la protéine NIK.^{104, 105, 109}

En revanche, il fut démontré que la surexpression de TRAF3 dans les cellules épithéliales favorise l'activation de la voie NF-κB, contrairement aux cellules B.^{110, 111} Ceci suggère que TRAF3 possède des fonctions dichotomiques tout dépendamment du type cellulaire. Plus d'études seront nécessaires afin de mieux identifier les diverses fonctions de TRAF3 dans la signalisation induite par le CD40.

1.4.5 TRAF4

TRAF4 est très peu exprimé par les cellules vasculaires. Il est plus important dans la physiologie des cellules neuronales et au cours de l'embryogenèse.^{112, 113} D'ailleurs, TRAF4 ne semble pas être en mesure d'interagir avec le CD40, mais plutôt avec les récepteurs neuronaux LTβR et p75.¹¹⁴

1.4.6 TRAF5

Très peu d'information existe quant au rôle de TRAF5 dans la signalisation induite par le CD40. TRAF5 est incapable d'interagir directement avec le CD40, mais il semble former un hétérodimère avec TRAF3, afin de faciliter l'activation de la voie NF-κB.⁸² Ceci fut démontré dans les cellules B où la déficience en TRAF5, à l'aide de petits ARN interférents, diminue significativement l'activation de la voie NF-κB, ce qui résulte en un défaut d'activation, d'expression de molécules co-stimulatrices et de production d'anticorps par ces cellules.^{115, 116} L'importance de TRAF5 commence tout juste à être explorée et l'élucidation exacte de son implication potentielle dans la signalisation dépendante du CD40 nécessitera plus d'études.

1.4.7 TRAF6

TRAF6 occupe une fonction importante dans les voies de signalisations déclenchées par le CD40 et ce dernier possède un site de liaison spécifique pour celui-ci.⁸² Chez les cellules fibroblastiques de l'embryon des souris déficientes en TRAF6 ou des cellules épithéliales humaines traitées par des petits ARN interférents spécifiques pour TRAF6, l'activation des voies NF-κB, p38, JNK et Akt est significativement diminuée ou même complètement inhibée suite à la stimulation par le CD40L, témoignant ainsi de l'importance fondamentale de ce membre.⁸³

Tel que discuté plus haut, TRAF6 interagit directement avec TRAF2 afin de réguler l'activation de NF-κB. La collaboration étroite qui existe entre TRAF6 et TRAF2 ne semble pas dépendre de l'interaction de cette première avec le récepteur CD40, puisque même en présence de la délétion du domaine de liaison de TRAF6 pour le CD40, TRAF6 est toujours en mesure d'interagir indirectement avec le CD40 par le biais de son interaction directe avec TRAF2 et d'activer plusieurs voies de signalisations importantes.¹¹⁷ Dans ces conditions (où le domaine de liaison avec le CD40 est supprimé), l'activation du CD40 mène quand même à l'expression du récepteur CD80 et à l'activation de la voie JNK, contrairement à la déficience totale de la

protéine TRAF6 dans les cellules B.¹¹⁷ Ceci suggère que l'une des fonctions importantes de TRAF6 est reliée à son interaction indirecte au CD40, via sa liaison à TRAF2.

Une des autres fonctions importantes de TRAF6 réside dans l'activation de la voie PI3K et l'activation subséquente de la protéine Akt, ce qui protège contre l'apoptose cellulaire. Suite à la stimulation par le CD40L, TRAF6 forme un complexe avec la protéine de la lignée lymphoblastique-B Casitas et la PI3 kinase. L'activation de ce complexe active la protéine Akt et favorise l'activation de plusieurs protéines anti-apoptotiques, telles que la caspase 9 et la cellule B lymphome ("B cell lymphoma", Bcl).^{118, 119}

1.4.8 JAK3

Les TRAFs jouent un rôle crucial dans la signalisation induite par le CD40 et leur implication est essentielle aux diverses réponses cellulaires déclenchées par l'interaction du CD40L au CD40. Par contre, il semble exister d'autres médiateurs signalétiques occupant une place importante dans ces mécanismes, telle que JAK3. Le CD40 possède un site de liaison pour JAK3 et il fut démontré que l'inhibition spécifique de cette protéine bloque la maturation des APCs en réponse au CD40L.^{85, 86, 120} De plus, au niveau des monocytes, la stimulation par le CD40L induit une phosphorylation importante de JAK3, soulignant ainsi une implication potentielle de cette dernière dans ces cellules.¹²¹ L'association de JAK3 au CD40 mène à l'activation du facteur de transcription STAT5 et à sa translocation vers le noyau cellulaire, où il semble être en mesure de réguler l'expression des gènes TNF- α , INF- γ et IL-6.¹²²

1.5 Implications physiologiques fonctionnelles de l'axe CD40/CD40L

Dans la section 1.3 de ce chapitre nous avons discuté de la fonction de l'axe CD40/CD40L dans les différentes cellules du système vasculaire. Dans cette section, nous ferons une analyse globale des principales fonctions physiologiques de cet axe, soit son implication dans l'immunité humorale et la production d'anticorps, son implication dans l'immunité cellulaire et la régulation de médiateurs inflammatoires, ainsi que son implication dans l'apoptose cellulaire.

1.5.1 Immunité humorale

Par définition, on appelle l'immunité spécifique humorale l'immunité liée aux lymphocytes B et à la production d'anticorps. Evidemment, ce phénomène nécessite la participation étroite des

lymphocytes T, ainsi que des APCs, telle que la cellule dendritique. Ensemble, ces éléments mènent ultimement à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et à la production d'immunoglobulines (IgA, IgE, IgG et IgM, par exemple).¹²³

L'importance de l'axe CD40/CD40L dans l'immunité humorale fut démontrée principalement par trois approches: premièrement par les manifestations et symptômes cliniques observés chez les patients atteints du syndrome HIGM,^{32, 124-127} deuxièmement par l'approche génétique (délétion des gènes du CD40 et CD40L) chez la souris,^{49, 128-130} et finalement par l'emploi d'anticorps ou de peptides bloquants dirigés contre le complexe CD40/CD40L.¹³¹⁻¹³³ Chacune de ces approches, telle que soulignées par de nombreuses études, pointe vers la même conclusion, soit que l'absence de l'interaction CD40/CD40L mène à un défaut sévère de production des immunoglobulines IgG, IgA et IgE (réponse dépendante du thymus, c'est-à-dire des lymphocytes T) en réponse à une infection pathogénique, sans toutefois affecter la réponse immunitaire indépendante des lymphocytes T.

Le complexe CD40/CD40L occupe une fonction cruciale dans l'immunité humorale grâce à son implication dans les interactions entre les cellules dendritiques (ou APC), les lymphocytes T et les lymphocytes B lors de la réponse immunitaire. Ces interactions cellulaires sont caractérisées principalement par deux étapes importantes, soit l'activation des lymphocytes T via les APCs (cellule dendritique en particulier) et l'activation et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes via leur interaction avec les lymphocytes T activés, ainsi que les cellules dendritiques.¹²³ La figure 1.8 illustre ces principales interactions cellulaires lors de l'immunité humorale tout en mettant en évidence l'importance du complexe CD40/CD40L dans ce processus.

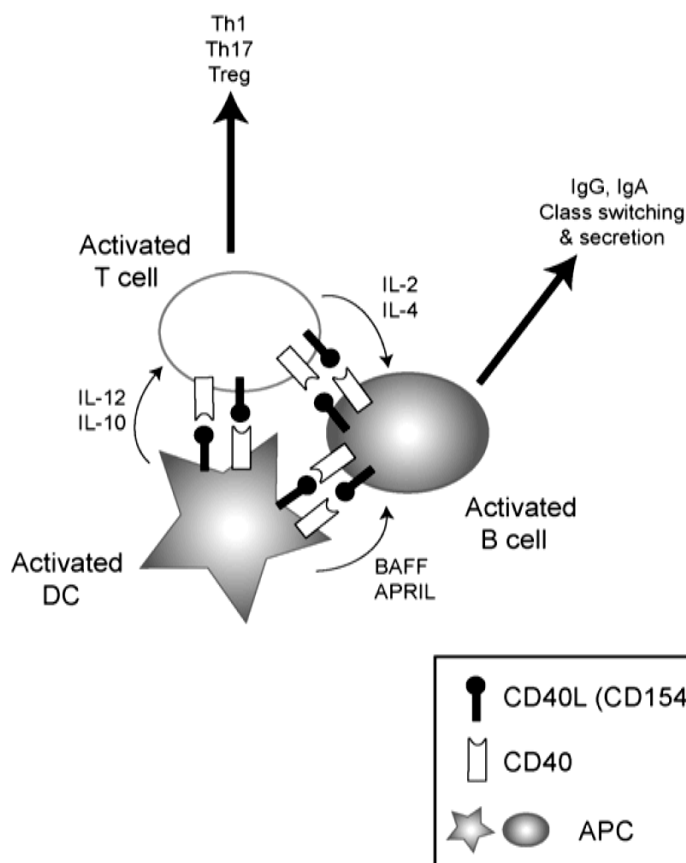


Figure 1.8 : Rôle du complexe CD40/CD40L lors de l'immunité humorale. DC= cellule dendritique. Ma DY. et al. *Seminars in Immunology*. 2009; 21:265-272.

L'exposition à un agent pathogénique (e.g. infection bactérienne) mène à l'activation du CD40 sur les cellules dendritiques.^{134, 135} Les cellules dendritiques sont par la suite en mesure d'interagir avec le CD40L des lymphocytes T activés, ce qui augmente l'expression des molécules co-stimulatrices B7-1/B7-2 et CD80/CD86, et favorise la relâche de l'IL-12 et IL-10 par les cellules dendritiques.^{53, 75, 123} Ces réponses cellulaires sont intimement impliquées dans la différenciation des lymphocytes T en cellules Th1 effectrices, T régulatrices et Th17 (IL-12 pour Th1 et IL-10 pour T régulatrices et Th17).^{77, 136, 137} Par la suite, l'interaction du CD40L des cellules T effectrices avec le CD40 des lymphocytes B induit la relâche de IL-2 et IL-4 par les cellules T effectrices.¹³⁸ Parallèlement, le complexe CD40/CD40L participe aussi à l'interaction des cellules dendritiques avec les lymphocytes B. Cette interaction facilite la sécrétion de la protéine stimulatrice des lymphocytes B ("B Lymphocyte Stimulator protein", BLyS ou BAFF) et du ligand inductible à prolifération ("A Proliferation Inducing Ligand" APRIL) par les cellules dendritiques, ce qui, en collaboration avec IL-2 et IL-4 relâchées par les lymphocytes T, favorise

la différenciation des lymphocytes B en cellules plasmiques productrices d'immunoglobulines.¹³⁹⁻¹⁴²

Il est important de noter qu'il est difficile de placer un ordre chronologique bien précis à ces événements, puisqu'en réalité ces interactions sont bidirectionnelles et peuvent se dérouler de manières simultanées. C'est-à-dire que les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les lymphocytes B sont en mesure d'interagir tous ensemble simultanément, indiquant la nécessité de considérer ces réponses cellulaires comme un ensemble et non en tant qu'éléments séparés. Bref, l'axe CD40/CD40L constitue un élément intégral nécessaire à la coopération entre ces différents éléments lors de la réponse humorale et la production d'anticorps.

1.5.2 Immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est la branche de la réponse immunitaire qui n'implique pas la production d'anticorps ni l'activation du système du complément. Elle est plutôt caractérisée par l'activation et la relâche de cytokines et chimiokines par toute cellule immunocompétente (cellule leucocytaire ou non) en réponse à un antigène. L'axe CD40/CD40L est sans doute impliqué dans cette facette de l'immunité, puisque l'interaction CD40/CD40L entraîne la sécrétion de plusieurs médiateurs inflammatoires par une panoplie de cellules, telle que les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les plaquettes, et autres...^{4, 143} Les médiateurs inflammatoires impliqués dans ces réponses peuvent être regroupés en six catégories, soit les cytokines, les chimiokines, les molécules d'adhésion, les MMPs, les facteurs de croissance et les facteurs pro-coagulants. Ensemble, ces médiateurs sont essentiels à la réponse immunitaire et inflammatoire, puisqu'ils facilitent l'activation et le recrutement d'autres cellules immunocompétentes aux sites en question, et participent aux mécanismes de régénération faisant suite à l'infection.^{48, 143} Le tableau 1.2 résume l'implication du complexe CD40/CD40L dans le contrôle de l'immunité cellulaire et dans la régulation de ces différents médiateurs inflammatoires.

Tableau 1.2 : Rôle de l'axe CD40/CD40L dans l'immunité cellulaire

Cytokines	Chemokines	Molécules d'adhésion	MMP	Facteurs de croissance	Facteurs Pro-coagulants
↑ IL-1 α / β ↑ IL-2 ↑ IL-4 ↑ IL-5 ↑ IL-6 ↑ IL-10 ↑ IL-12 ↑ IL-15 ↑ IL-18 ↑ TNF- α / β ↑ INF- γ	↑ IL-8 ↑ MIP-1 α / β ↑ RANTES ↑ MCP-1 ↑ ABCD-1 ↑ CCR1 ↑ CCR5	↑ LFA-1 ↑ ICAM-1 ↑ VCAM-1 ↑ E-sélectine ↑ P-sélectine ↑ VLA-1	↑ MMP-1 ↑ MMP-2 ↑ MMP-3 ↑ MMP-7 ↑ MMP-8 ↑ MMP-9 ↑ MMP-10 ↑ MMP-11 ↑ MMP-12 ↑ MMP-13	↑ VEGF ↑ FGF ↑ M-CSF ↑ GM-CSF ↓ TGF- β	↑ Facteur tissulaire ↓ Thrombomoduline

1.5.3 Apoptose cellulaire

Plusieurs données expérimentales pointent vers l'importance du complexe CD40/CD40L dans l'apoptose cellulaire. Cependant, la liaison du CD40 semble induire, soit un signal pro-apoptotique, soit un signal anti-apoptotique (survie cellulaire), tout dépendant du type cellulaire. En général, l'activation du CD40 au niveau des lymphocytes B et T induit un signal anti-apoptotique et de survie cellulaire,¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ tandis que son activation au niveau de plusieurs lignées tumorales, telle que la lignée lymphoblastique B, entraîne l'apoptose cellulaire.¹⁴⁸⁻¹⁵¹

Tel que discuté plus haut, la liaison du CD40 au niveau des lymphocytes B engendre la prolifération, la différenciation et la survie de ces cellules. En effet, le blocage de l'interaction CD40/CD40L, par approche génétique ou pharmacologique, prévient la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et provoque la mort cellulaire (apoptose).^{1, 152} Les effets anti-apoptotiques observés suite à l'activation du CD40 dans les cellules B passent principalement par une augmentation des protéines anti-apoptotiques Bcl-XL, A20, Bfl-1, Mcl-1, survivine et cFLIP (Figure 1.9). Ces facteurs protègent la cellule contre l'apoptose en réponse à certains agents apoptotiques extrinsèques, tels que les IgMs, le FasL (Fas ligand) et le TNF, et intrinsèques, tels que les agents d'endommagement mitochondriale.¹⁵³⁻¹⁵⁷

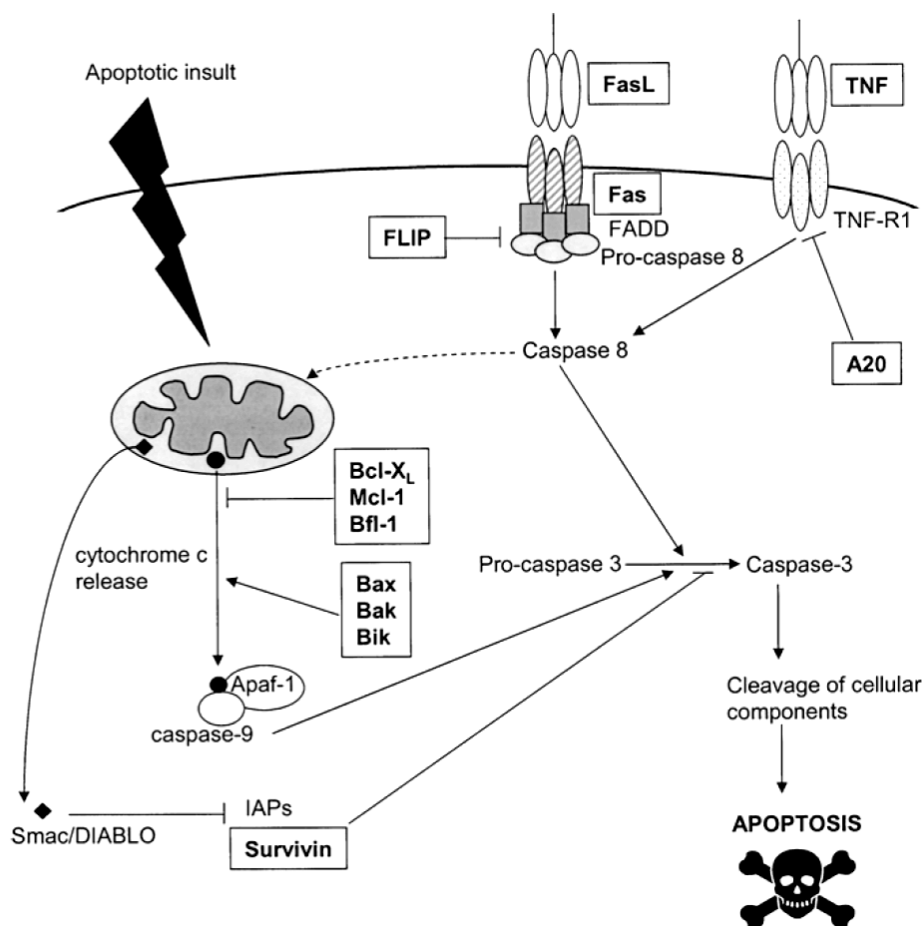


Figure 1.9 : Les mécanismes signalétiques impliqués dans les effets apoptotiques et anti-apoptotiques induit par l'activation du CD40. La liaison du CD40 au niveau des cellules B prévient l'apoptose par l'entremise de voies intrinsèques et extrinsèques. La voie intrinsèque comprend une augmentation des facteurs anti-apoptotiques Bcl-xL, Mcl-1 et Bfl-1, ce qui inhibe l'activation du complexe cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 et l'activation de la caspase-3. L'activation du CD40 augmente aussi la protéine inhibitrice de l'apoptose survivine qui inhibe aussi la caspase-3. La voie extrinsèque provient de l'activation des protéines A20 et cFLIP, et de leurs effets inhibiteurs sur l'activation des récepteurs au TNF et au FasL, respectivement. Contrairement aux cellules B, l'activation du CD40 sur les cellules tumorales engendre l'activation des protéines apoptotiques Bax, Bak et Bik, et favorise la liaison du FasL et du TNF à leurs récepteurs respectifs, le tout favorisant la mort cellulaire. Dallman C. et al. *Apoptosis*. 2003; 8:45-53.

Contrairement aux cellules B normales, l'activation du CD40 sur certaines cellules tumorales et lymphoblastiques B, engendre des effets antiprolifératifs et apoptotiques importants. En réponse au CD40L, les protéines apoptotiques Bax, Bak et Bik se retrouvent augmentées, favorisant ainsi l'activation de la caspase-3 (Figure 1.9).^{158, 159} Par ailleurs, l'activation du CD40 sur les cellules tumorales favorise aussi la liaison du FasL et du TNF à leurs récepteurs respectifs, ce qui résulte à l'augmentation de la caspase 8 et à l'apoptose cellulaire.¹⁶⁰⁻¹⁶³

Bref, le complexe CD40/CD40L joue un rôle important dans l'apoptose cellulaire et le signal induit par l'activation du CD40, soit pro-apoptotique ou anti-apoptotique, dépend

largement du type cellulaire en question. Le CD40L constitue d'ailleurs une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des complications associées à certains cancers, étant donné ses effets apoptotiques spécifiques aux niveaux des cellules tumorales.

1.6 Implications pathologiques de l'axe CD40/CD40L

L'inflammation est une composante intégrale associée à une multitude de complications vasculaires. Étant donné la contribution importante du complexe CD40/CD40L dans les mécanismes de l'immunité et de l'inflammation, il n'est pas surprenant qu'il soit étroitement impliqué dans le développement et la progression de certaines pathologies vasculaires et autres. Dans cette section nous discuterons du rôle de l'axe CD40/CD40L dans l'athérosclérose, le cancer, et les maladies auto-immunes, les principales complications auxquelles cet axe attire le plus d'attention.

1.6.1 L'athérosclérose

L'athérosclérose est sans doute la complication à laquelle le complexe CD40/CD40L fut l'objet du plus grand nombre d'études. Depuis quelques années maintenant, l'athérosclérose est clairement caractérisée comme une maladie inflammatoire chronique, impliquant la grande majorité des cellules du système vasculaire, soit les leucocytes, les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules musculaires lisses. Tel que discuté auparavant, l'axe CD40/CD40L occupe une fonction immunitaire/inflammatoire importante au sein de chacune de ces cellules et son implication dans l'athérosclérose fut bel et bien démontrée, tant par approche pharmacologique que génétique.

En 1998, Mach et al. démontrèrent que le traitement des souris dyslipidémiques LDLR^{-/-} à l'aide d'un anticorps anti-CD40L réduit significativement la taille et le contenu en lipides des lésions athérosclérotiques.¹⁶⁴ Par la suite, Lutgens et al. confirmèrent ces résultats par approche génétique en démontrant que la surface de la plaque chez la souris CD40L^{-/-}/ApoE^{-/-} est 5.5 fois moins importante que chez la souris ApoE^{-/-} (souris athérosclérotiques marquées par un taux élevé de cholestérol circulant).¹⁶⁵ De plus, ces souris démontrent un contenu en collagène largement plus riche que les souris témoins, illustrant ainsi la stabilité de la plaque. Finalement, l'administration d'un anticorps anti-CD40L chez la souris ApoE^{-/-}, soit au début de l'athérosclérose ou une fois les lésions bien développées, stabilise et diminue le contenu lipidique

de la plaque, ce qui témoigne de l'importance du complexe CD40/CD40L au niveau des différents stades de l'athérosclérose.^{166, 167}

Les mécanismes par lesquelles l'axe CD40/CD40L favorise le développement et la progression de la plaque athérosclérotique sont largement similaires à ceux impliqués dans la contribution de cet axe dans l'immunité cellulaire (section 1.5.2 et tableau 1.2 de ce chapitre), étant donné la nature inflammatoire importante de l'athérosclérose. La pathologie est souvent définie comme un dérèglement de la physiologie, touchant les mêmes joueurs et médiateurs cellulaires impliqués dans l'homéostasie, et l'athérosclérose ne fait pas exception ici. Le complexe CD40/CD40L est impliqué dans les trois principales phases de l'athérosclérose, soit l'initiation, la progression et la stabilité de la plaque, tel qu'illustré dans la figure 1.10.

1.6.1.1 Initiation de la plaque

L'initiation de la plaque athérosclérotique est principalement caractérisée par l'accumulation de lipoprotéines de faible densité ("Low Density Lipoproteine", LDL) au niveau de l'endothélium vasculaire et le recrutement (et la transmigration) de leucocytes aux sites en question.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ L'axe CD40/CD40L participe significativement à cette étape par le biais de son implication dans le recrutement et la transmigration de cellules immunocompétentes (lymphocytes T, monocytes et neutrophiles) à l'endothélium activé. L'élément déclencheur responsable de l'augmentation des récepteurs CD40 et CD40L au niveau des cellules endothéliales et immunocompétentes lors de l'initiation de la plaque n'est pas encore déterminé. Cependant, l'augmentation des LDL oxydées, certaines infections (pneumonie ou autres) ou des altérations hémodynamiques vasculaires demeurent des candidats potentiels.¹⁷¹⁻¹⁷³ La liaison du CD40 sur les cellules endothéliales, tel qu'observée suite à l'adhésion des lymphocytes T activées via le CD40L, engendre l'augmentation de plusieurs molécules d'adhésion (E-sélectine, P-sélectine, VCAM-1, ICAM-1 et LFA-1) et induit la relâche de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-15, MCP-1, MIP-1 α/β et RANTES) par l'endothélium, ce qui permet le recrutement, l'adhésion et la transmigration de leucocytes additionnels aux sites de lésions, les monocytes en particulier (Figure 1.10 a).^{3, 143, 174-}

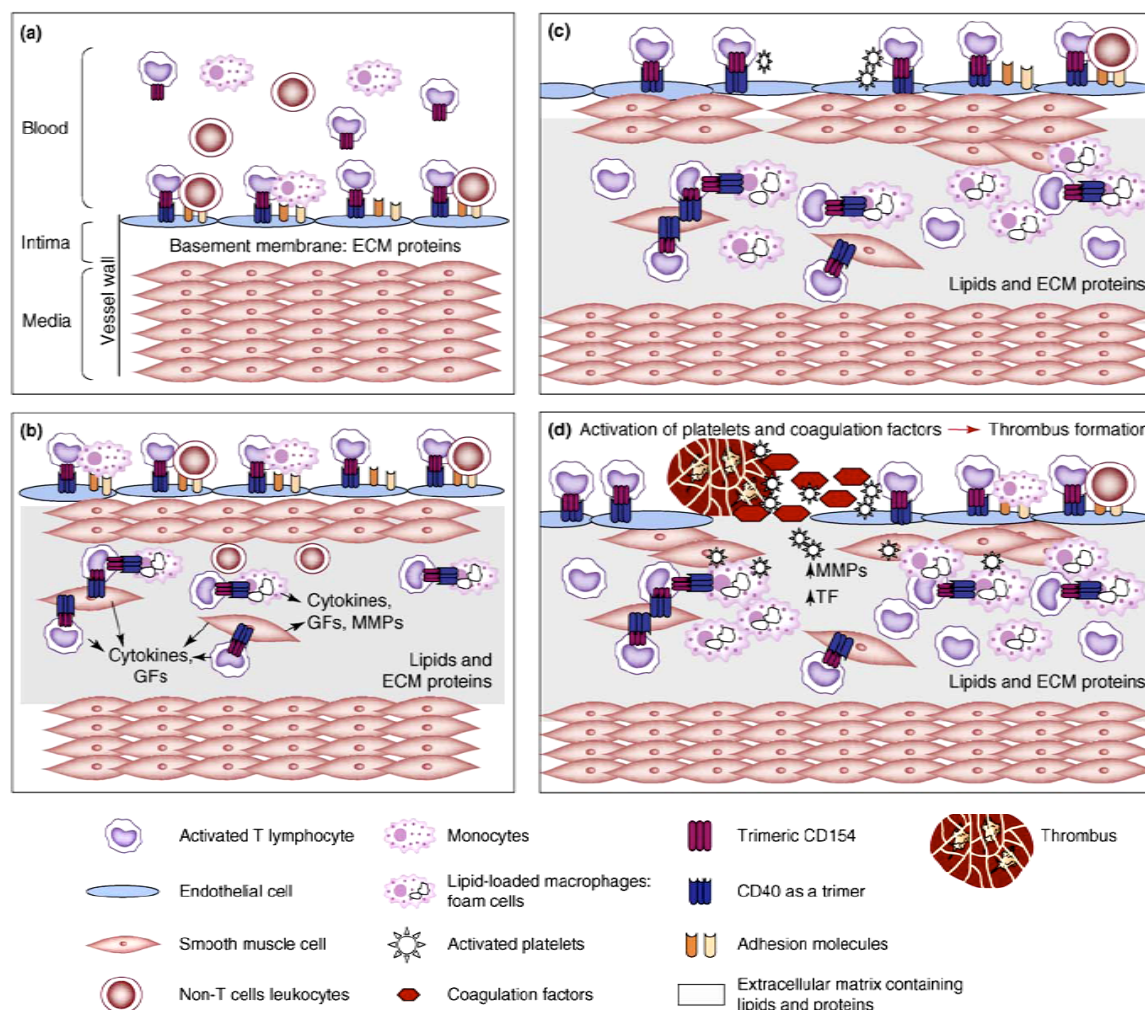


Figure 1.10 : Rôle de l'axe CD40/CD40L dans l'initiation (a), la progression (b et c) et la stabilité (d) de la plaque athérosclérotique. Hassan GS. et al. *Trend in Immunology*. 2009; 30:165-172.

1.6.1.2 Progression de la plaque

La progression de la plaque est principalement caractérisée par la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins supportant la croissance de la lésion. Au cours de cette étape, on assiste à la formation d'une plaque athéromateuse délimitée par un chapeau fibreux comprenant un centre riche en corps lipidiques, cellules spumeuses et cellules inflammatoires. Une fois dans l'espace sous-endothélial, les macrophages (originellement des monocytes) sont en mesure de phagocyter les LDL oxydées ayant pénétré dans l'intima.¹⁷⁹ Cette réaction mène par la suite à la formation de cellules spumeuses. Le CD40 des macrophages modifiés (cellules spumeuses) interagit avec le CD40L des lymphocytes T infiltrés, ce qui favorise la relâche de cytokines (IL-1, IL-6 et IL-12), facteurs

de croissance (VEGF) et MMPs (MMP-1 et MMP-3), le tout menant à la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vers l'intima.^{178, 180} De plus, les cellules musculaires lisses en prolifération expriment le CD40 et interagissent donc avec le CD40L des lymphocytes T. Cette interaction amplifie la réaction inflammatoire et la formation de la plaque athéromateuse (Figure 1.10 b).¹⁴³ En effet, la stimulation des cellules musculaires lisses par le CD40L induit la sécrétion des cytokines MCP-1 et IL-8.^{72, 180} Par ailleurs, l'accumulation de fibroblastes dans la zone intimale participe aussi aux réactions inflammatoires en cours. L'interaction du CD40L des cellules leucocytaires avec le CD40 des fibroblastes facilite la relâche des cytokines chimiotactiques IL-6 et IL-8.¹⁸¹⁻¹⁸³

Tel que discuté plus haut, l'angiogénèse demeure un aspect crucial de la progression de la plaque athéromateuse et l'axe CD40/CD40L participe aussi à ce phénomène. En effet, la liaison du CD40 sur les cellules endothéliales et les macrophages induit la sécrétion de plusieurs agents angiogéniques, tels que les facteurs de croissance VEGF, FGF et PAF, ainsi que la MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9.^{7, 69, 184, 185} Ensemble, ces éléments favorisent la croissance de nouvelles cellules endothéliales (facteurs de croissance) de même que la dégradation de la matrice extracellulaire (MMPs), deux éléments clés de l'angiogénèse.

Une fois le processus inflammatoire évolué, les lésions se retrouvent de plus en plus avancées et on assiste à une progression vers une plaque athéromateuse stable. Cette dernière est caractérisée par l'accumulation de cellules inflammatoires, de cellules spumeuses, de particules riches en lipides et de protéines de la matrice extracellulaire dans le corps de la plaque.¹⁸⁶ De plus, la plaque comprend la présence de cellules musculaires lisses ayant proliféré de la média à l'intima, formant ce qu'on appelle la néointima (Figure 1.10 c)

1.6.1.3 Stabilité de la plaque

La rupture de la plaque représente l'étape finale des phénomènes associés à l'athérosclérose. Elle est, sans doute, l'étape la plus dangereuse car elle mène vers la thrombose vasculaire via le système de l'agrégation plaquettaire et celui de la coagulation sanguine. Il est rare que l'évolution de la plaque elle-même résulte en une accumulation de cellules et lipides au point où la lumière de l'artère se trouve complètement obstruée. C'est plutôt la rupture de la plaque et l'exposition aux composantes de la matrice extracellulaire qui enclenchent la formation du thrombus riche en plaquettes et fibrine.

La vulnérabilité de la plaque est mise en question lorsqu'il se produit une dégradation de la matrice extracellulaire, ce qui expose la lumière de l'artère aux substances pro-agrégantes, tel que le collagène. Il semblerait qu'une longue série de MMPs soit impliquées dans ce phénomène. Effectivement, la stimulation des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages par le CD40L, provoque une sécrétion accrue de MMPs, comme la MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 et la MMP-13.^{7, 59, 101, 187} Un des aspects importants de la rupture de la plaque athérosclérotique est la perte du collagène interstitiel (fibrillaire), composante intrinsèque du chapeau de la plaque fibreuse. La perte de cette protéine engendre la rupture de la plaque, ce qui expose les composantes de la matrice sous-endothéliale (e.g. collagène extracellulaire), le tout favorisant ainsi l'adhésion des plaquettes et la formation du thrombus.^{73, 188-190} D'après l'étude effectuée par Sukhova GK. et al, il y aurait une augmentation de collagénases (MMP-1 et MMP-13) aux sites de lésions athérosclérotiques, ce qui résulterait en une perte de l'accumulation de collagène et, par conséquent, en une vulnérabilité accrue à la formation d'un thrombus.¹⁹⁰

Il existe, à ce jour, plusieurs études qui pointent vers un rôle prédominant du CD40/CD40L dans la formation du thrombus. Par exemple, la liaison du CD40 sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages provoque une libération accrue de substances pro-coagulantes, tel que le facteur tissulaire, un puissant stimulateur de la coagulation sanguine et de l'activation plaquettaire.^{59, 191-193} De plus, le CD40L constitue un agoniste plaquettaire direct et un stimulateur de la thrombose, par l'entremise de son interaction avec l'intégrine plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{28, 29} Cet aspect sera discuté en détail dans le troisième chapitre.

1.6.2 Le cancer

À première vue, le complexe CD40/CD40L semble faciliter le développement et la progression du cancer, tel que souligné par les hauts niveaux d'expression de ces protéines à la surface de plusieurs cellules tumorales.^{159, 194-196} Par exemple, il fut démontré que les cellules tumorales du lymphome non hodgkinien, de la leucémie lymphoïde chronique et du lymphome de burkitt exploitent le système CD40/CD40L comme outil de survie et de croissance cellulaire, principalement par l'entremise de la voie signalétique NF- κ B.^{197, 198} De plus, il existe une corrélation positive entre les niveaux d'expression du CD40L sur certaines cellules tumorales et

le degré d'agressivité et d'évolution de ces cellules.¹⁹⁶ Cependant, après réexamen de la fonction de ce complexe dans la physiopathologie du cancer, on arrive à la conclusion que l'axe CD40/CD40L occupe plutôt un rôle négatif dans la pathogenèse du cancer. Certes, l'observation la plus définitive soutenant cette constatation provient des symptômes observés chez les patients atteints du syndrome XHIM (mutation génétique causant une anormalité sévère de l'interaction du CD40L avec le CD40), chez lesquelles on dénote une fréquence élevée de plusieurs lymphomes et carcinomes.¹⁹⁹ En effet, plusieurs cellules tumorales cherchent à déréguler le système CD40/CD40L afin de maintenir leur croissance et survie cellulaire. À titre d'exemple, les lymphocytes T CD4⁺ de patients souffrant de la leucémie lymphoïde chronique tentent de supprimer leur expression en CD40L membranaire, soit par clivage enzymatique ou par un défaut de mobilisation membranaire suite à l'activation.²⁰⁰ Ces mécanismes compensatoires serviraient à échapper aux effets anti-tumoraux des lymphocytes T cytotoxiques et de la cellule tueuse naturelle ("Natural Killer", NK) lors de la réponse immunitaire. Par ailleurs, Hock et al. ont rapporté que les patients atteints de la leucémie myéloïde aigüe et du myélome multiple possèdent des niveaux élevés du récepteur CD40 soluble (sCD40) en circulation, réduisant ainsi la réponse cellulaire au CD40L et corrèle avec un faible pronostic chez ces patients.²⁰¹ De plus, dans une large étude comprenant 1776 patients souffrants du lymphome non-hodgkinien et 2482 patients contrôles, on observa une importante association entre le développement de divers lymphomes et une mutation dans le gène du CD40, ce qui résulte en de bas niveaux de la protéine.²⁰² Bref, toutes ces études suggèrent que le complexe CD40/CD40L réduit la croissance et la survie des cellules tumorales.

Les mécanismes par lesquelles l'axe CD40/CD40L contribue négativement à la progression tumorale semblent être bien caractérisés et ces derniers incluent des effets indirects et directs sur la cellule tumorale. Premièrement, le complexe CD40/CD40L est intimement lié à la production des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK qui agissent directement sur les cellules tumorales afin d'induire leur mort cellulaire (effets indirectes).²⁰³ Par ailleurs, la liaison du CD40 sur les cellules tumorales déclenche un signal pro-apoptotique, ce qui favorise la mort cellulaire et engendre l'augmentation de molécules d'adhésion et de protéines membranaires, tel que le transporteur peptidique de l'antigène-1 ("Antigen Peptide Transporter-1", TAP1).²⁰⁴ Cette liaison facilite donc la reconnaissance et l'interaction des cellules immunitaires anti-tumorales (effets directs).

1.6.2.1 Production de cellules immunocompétentes anti-tumorales

L'immunité spécifique tumorale dépend largement de la collaboration étroite entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T. La liaison du CD40 sur la cellule dendritique par le CD40L des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ induit la production de cytokines inflammatoires et de molécules d'adhésion essentielles à l'activation des cellules T cytotoxiques et des cellules NK. En effet, cette interaction mène à la relâche des cytokines IL-12 et INF γ et à l'augmentation des molécules d'adhésions MHCI et MCHII (ainsi que d'autres molécules co-stimulatrices) par les cellules dendritiques.^{75, 205} Ceci leur permet donc d'interagir avec les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK, facilitant ainsi leur activation. Suite à leur activation, les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK agissent directement sur les cellules tumorales et favorise l'apoptose de ces cellules via la sécrétion d'enzymes cytotoxiques, telle que la perforine et la granulysine.

L'implication du complexe CD40/CD40L dans ces phénomènes est supportée par plusieurs données expérimentales convaincantes. Premièrement, l'emploi d'anticorps causant l'activation du CD40 favorise l'expansion des cellules T cytotoxiques et protège contre le développement tumoral.²⁰⁶⁻²⁰⁸ De plus, les souris CD40 déficientes démontrent des défauts importants d'activation des cellules T cytotoxiques suite à l'exposition de diverses tumeurs, ce qui se répercute en une forte résistance et progression tumorale.²⁰⁹ Finalement, l'emploi d'anticorps bloquants contre le CD40L chez la souris résulte en une immunité tumorale affaiblie, comparativement aux souris contrôles.²¹⁰⁻²¹⁴

1.6.2.2 Apoptose tumorale

Telle que discutée dans la section 1.5.3 de ce chapitre, l'activation du CD40 sur plusieurs lignées tumorales induit un signal pro-apoptotique causant la mort cellulaire. Par exemple, la stimulation des cellules du lymphome B, des cellules du myélome multiple et des cellules du lymphome de burkitt par le CD40L, diminue significativement la prolifération et la survie cellulaire, tant *in vitro* que dans divers modèles expérimentaux *in vivo* chez la souris.^{148, 149, 151} Ces effets antiprolifératifs furent aussi démontrés au niveau des tumeurs solides, tels que les carcinomes de la vessie, des ovaires et de la peau. Effectivement, le traitement de ces carcinomes par une forme recombinante du CD40L inhibe la prolifération cellulaire maligne et augmente significativement la durée de vie chez la souris.^{159, 162, 215-217}

Les voies signalétiques pro-apoptotiques déclenchées suite à la liaison du CD40 sur les cellules tumorales ont déjà été révisées ultérieurement dans ce chapitre. Ces derniers incluent principalement l'activation des protéines Bax, Bak et Bik, ainsi qu'une sensibilité accrue aux effets apoptotiques du FasL et du TNF (figure 1.9).^{158, 159, 218}

1.6.2.3 Augmentation d'antigènes immunitaires anti-tumoraux

Une des caractéristiques importantes de la survie et de l'expansion tumorale repose sur la capacité des cellules malignes à s'évader du système immunitaire. La réponse immunitaire tumorale dépend largement de l'exposition d'antigène peptidique par le complexe MHC à la surface des cellules tumorales, ce qui facilite la reconnaissance aux cellules cytotoxiques CD8⁺. Ce processus est régulé par un complexe de protéases et de transporteurs spécifiques, tels que la famille des TAPs (TAP1 et TAP2) et la tapasine. Les TAPs sont des transporteurs spécifiques impliqués dans la présentation de l'antigène peptidique aux molécules du complexe MHC, tandis que la tapasine est une chaperonne responsable de l'assemblage de ce complexe.^{203, 219}

Plusieurs études pointent vers l'importance du complexe CD40/CD40L dans la régulation de la présentation d'antigène à reconnaissance immunitaire par la cellule tumorale. L'activation du CD40 semble réactiver ce processus de présentation d'antigène préalablement perdue par les cellules tumorales et restore ainsi l'influence du système immunitaire sur ces cellules.^{41, 204, 220} Effectivement, il fut démontré que la liaison du CD40 sur les cellules tumorales du lymphome de Burkitt et des carcinomes du col utérin augmente significativement l'expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 et des protéines TAP1, TAP2, MHCI, et tapasine.^{41, 221} Ces réponses cellulaires augmentent la reconnaissance immunitaire par les cellules cytotoxiques T, ce qui favorise significativement la mort cellulaire. Par ailleurs, la stimulation des cellules de la leucémie chronique lymphoblastique B, du lymphome folliculaire et de la leucémie myéloïde aigüe par le CD40L, augmente aussi l'expression des molécules d'adhésions co-stimulatrices CD70, B7.1, B7.2 et B7.2, ainsi que du récepteur apoptotique Fas.²²² L'augmentation des antigènes et molécules d'adhésion à la surface des cellules tumorales semble dépendre de la voie signalétique de la NF- κ B, puisque l'inhibition spécifique de cette voie renverse les effets pro-apoptotiques (via les cellules T cytotoxiques et les cellules NK) du CD40L sur la cellule tumorale.²²³

1.6.3 Les maladies auto-immunes et maladies inflammatoires chroniques

Par définition, les maladies auto-immunes sont le résultat d'une hyperréactivité du système immunitaire à l'encontre de substances ou de tissus qui sont normalement présents dans l'organisme.⁹ Étant donné sa contribution importante dans l'immunité, il n'est pas surprenant d'apprendre que le complexe CD40/CD40L occupe aussi un rôle prédéterminant dans plusieurs maladies auto-immunes. Dans cette section, nous ferons un survol des mécanismes et modes d'action par lesquels le système CD40/CD40L contribue aux maladies auto-immunes, tout en discutant des principales complications auxquelles ce complexe y est associé, soit la thyroïdite, le diabète de type I, la sclérose en plaques, les maladies inflammatoires de l'intestin, l'arthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé.

1.6.3.1 Mécanismes d'action

Trois principaux modes d'action possibles par lesquels l'axe CD40/CD40L contribue aux maladies auto-immunes dépendantes des lymphocytes T ont été postulés (figure 1.11).

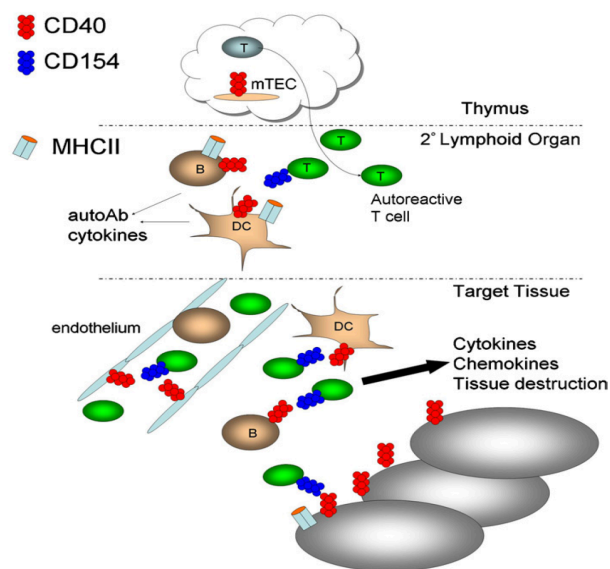


Figure 1.11 : Mécanismes d'action potentiels par lesquels le complexe CD40/CD40L contribue aux maladies auto-immunes. L'activation du CD40 contribue potentiellement aux maladies auto-immunes de plusieurs façons. 1) Au cours de la sélection des lymphocytes T au niveau du thymus, ce qui permettrait à certaines cellules T auto réactives d'échapper à la sélection négative. 2) Au niveau des organes lymphoïdes secondaires où les cellules T interagissent avec les lymphocytes B et/ou les cellules dendritiques. 3) Au niveau des organes cibles où la signalisation induite par le CD40 mène à une production de cytokines inflammatoires impliquées dans la destruction des tissus en question. Peters AL. et al. *Seminars in Immunology*. 2009; 21:293-300.

Premièrement, l'activation du CD40 au cours de la sélection des lymphocytes T au niveau du thymus pourrait favoriser la production de clones (lymphocytes T) auto réactifs ayant

échappés aux mécanismes de délétions cellulaires. La sélection négative de cellules potentiellement autoréactives est régulée par les cellules épithéliales médullaires du thymus et il fut démontré que ce processus nécessite la coopération entre le CD40 et le récepteur activateur du NF- κ B ("Receptor Activator for NF- κ B", RANK),²²⁴ aussi membre de la famille des récepteurs du TNF. Une anomalie quelconque (activation exagérée ou défaut d'activation) au niveau de ce système pourrait potentiellement mener à la production de cellules T autos réactives et au développement de certaines complications auto-immunes (figure 1.11, haut de la figure).

Deuxièmement, une activation accrue du CD40 au niveau des organes lymphoïdes secondaires (nœuds lymphatiques), où se déroule l'immunité spécifique et la production d'anticorps, pourrait favoriser une surproduction de cytokines et d'auto anticorps circulants contribuant au développement des maladies auto-immunes. En effet, il fut démontré qu'une augmentation des niveaux membranaire de CD40 (soit constitutif ou suite à l'activation) résulte en une augmentation des interactions CD40/CD40L, ce qui potentiellement mène à une réponse immunitaire exagéré (figure 1.11, milieu de la figure).⁷⁷

Finalement, une signalisation anormale induite par le CD40 au niveau des tissus ou organes cibles eux-mêmes pourrait contribuer aux maladies auto-immunes, en particulier lorsque les niveaux d'expression du CD40 sur ces tissus varient d'une expression faible ou inexistante à une expression forte. Par exemple, il a été démontré que des niveaux d'expression membranaire élevés de CD40 au niveau des cellules cibles des maladies en question (cellules de la glande thyroïde pour la maladie de Graves et du pancréas pour le diabète) contribue à l'initiation de la maladie de Graves et à la production de cytokines inflammatoires impliquées dans le rejet de transplantation d'îlots pancréatiques chez les patients diabétiques.²²⁵⁻²²⁹

1.6.3.2 La thyroïdite

La thyroïdite est une inflammation de la glande thyroïde affectant environ 5% de la population en général.²³⁰ La maladie de Graves et la thyroïdite de Hashimoto sont les deux principales maladies inflammatoires de la thyroïde impliquant le complexe CD40/CD40L. La maladie de Graves est caractérisée par une hyperthyroïdite, par une infiltration accrue de leucocytes au niveau de la glande, par la présence d'un goitre et par la présence d'anticorps contre le récepteur de la thyroïdostimuline, tandis que la thyroïdite de Hashimoto est caractérisée par une forme plus sévère de ces manifestations (et les anticorps sont dirigés contre la thyroglobuline plutôt).

Le CD40 est exprimé de manière aberrante au niveau des cellules épithéliales dans la maladie de Graves,^{231, 232} ce qui pourrait expliquer la présence d'auto antigènes reconnus par les lymphocytes T. Il fut démontré qu'un polymorphisme nucléotidique dans l'allèle C de la séquence Kozak du gène CD40 est associé à une augmentation significative de développer la maladie de Graves.²³⁰ De plus, les individus atteints de ce polymorphisme ont des niveaux élevés d'ARN du CD40 au niveau des lymphocytes B, ce qui se traduit également par une augmentation d'expression de la protéine.²³³

Aucun polymorphisme génétique n'a été identifié pour la thyroïdite de Hashimoto. Par contre, l'emploi d'anticorps anti-CD40L prévient le développement de la maladie dans un modèle expérimental chez la souris.²³⁴ De plus, la stimulation de lymphocytes B et T traités à la thyroglobuline par le CD40L est nécessaire au développement de la thyroïdite de Hashimoto, confirmant ainsi l'importance du système CD40/CD40L dans cette maladie auto-immune.²³⁵

1.6.3.3 Le diabète de type I

Le diabète de type I provient de la destruction des îlots beta du pancréas, ce qui mène à la perte totale de la sécrétion d'insuline par l'organisme.²³⁶ Un des modèles diabétiques le plus étudié est celui de la souris diabétique non obèse ("Non-Obese Diabetic", NOD) qui développe spontanément le diabète suite à une inflammation des îlots beta de Langerhans secondaire à une infiltration leucocytaire importante. Les lymphocytes B jouent un rôle essentiel dans le développement du diabète, puisque la délétion de ces cellules protège les souris NOD contre l'apparition de cette maladie.²³⁶⁻²³⁸ Ceci s'explique par la présence d'auto anticorps contre l'insuline et l'acide glutamique décarboxylase (GAD) retrouvés chez la souris NOD et chez les patients diabétiques.^{236, 239}

Certaines données expérimentales pointent vers l'importance de l'axe CD40/CD40L dans le diabète de type I. Par exemple, le blocage spécifique de l'interaction CD40/CD40L à l'aide d'anticorps retarde significativement l'apparition du diabète chez la souris NOD;^{240, 241} résultats qui furent aussi confirmés dans un autre modèle diabétique chez le rat.²⁴² Les cellules beta du pancréas expriment constitutivement le CD40 et sa stimulation mène à la relâche de cytokines inflammatoires potentiellement impliquées dans la destruction de ces cellules par le système immunitaire.^{225, 243} Par ailleurs, le rôle des lymphocytes T CD40⁺ dans le diabète fut investigué et les résultats d'une récente étude démontrent que l'activation du CD40 des cellules T chez la

souris NOD contribue à la pathogenèse de cette maladie.²⁴⁴ Le CD40 faciliterait l'activation de voies cellulaires additionnelles, en plus d'inhiber l'expression de l'antigène cytotoxique-4 des lymphocytes T, une protéine impliquée dans l'inhibition des lymphocytes T.

1.6.3.4 La sclérose en plaques

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central. Cette maladie auto-immune est liée à une infiltration de lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$), de lymphocytes B, de macrophages, et de cellules gliales au niveau du cerveau et de la moelle épinière, causant ainsi une destruction de la myéline des fibres nerveuses.²⁴⁵ La grande majorité des connaissances scientifiques acquises sur la pathophysiologie de cette maladie provient de tissus du cerveau de patients post mortem ou du modèle d'encéphalopathie auto-immun expérimental ("Experimental autoimmune encephalomyelitis", EAE) chez la souris, dans lequel on dénote une infiltration des cellules immunitaires au niveau du système nerveux central suite l'immunisation des souris avec des composantes de la myéline.²⁴⁵

Dans ce modèle (EAE), le CD40 est fortement exprimé dans la moelle épinière lors de la phase aiguë et de la phase de rechute de la maladie, tandis que le CD40L n'est fortement exprimé que lors de la phase de rechute.²⁴⁶ Les souris CD40L déficientes sont protégées contre l'EAE, de par le défaut d'activation et de maturation des APC.²⁰⁵ De plus, l'administration d'un anticorps bloquant anti-CD40L au tout début de la phase d'induction de l'EAE prévient le développement de la maladie.²⁴⁷ Le blocage de l'interaction CD40/CD40L préviendrait possiblement l'expansion des lymphocytes T vers une réponse immunitaire Th1, favorisant ainsi une différenciation vers la voie non pathogénique Th2 au niveau du système nerveux central.²⁴⁸⁻²⁵⁰

Les cellules gliales expriment aussi le CD40, surtout suite à leur stimulation par l'INF- γ .²⁵¹ L'activation du CD40 au niveau de ces cellules favorise la relâche des cytokines IL-12 et TNF, ce qui engendre l'apoptose cellulaire.²⁵¹⁻²⁵³ En effet, il fut démontré que l'expression du CD40 sur les cellules gliales est critique au développement de la sclérose en plaques, tel que souligné par le développement d'une EAE significativement moins sévère chez les souris ayant subi une délétion du CD40 spécifiquement au niveau de ces cellules.^{253, 254}

Finalement, une étude récente vient de démontrer l'association entre un polymorphisme génétique sur la séquence du CD40 et l'incidence de la sclérose en plaques,²⁵⁵ supportant de plus la contribution de ce récepteur dans le développement de cette maladie. Par contre, l'effet de ce

polymorphisme sur le degré d'expression ou la fonction de la protéine du CD40 n'est toujours pas déterminé.

1.6.3.5 Les maladies inflammatoires de l'intestin

La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont les deux principales complications auto-immunes de l'intestin. Elles sont caractérisées par une inflammation récurrente du petit et du gros intestin, ainsi que par une infiltration de cellules T, de cellules B et de macrophages au niveau de l'épithélium intestinal.²⁵⁶ Ceci affecte l'intégrité de la paroi intestinale et cause la diarrhée, des douleurs abdominales, des saignements rectaux et une malnutrition chez les patients affectés par ces maladies.

Le CD40 est surexprimé par les cellules endothéliales microvasculaires de la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn.²⁵⁷ De plus, on retrouve significativement plus de cellules dendritiques CD40 positives au niveau de la muqueuse intestinale de ces patients.²⁵⁸ L'importance du complexe CD40/CD40L dans les maladies inflammatoires de l'intestin fut principalement déterminée à l'aide d'études effectuées chez la souris. L'administration d'un anticorps anti-CD40L au début de l'apparition des colites, prévient la maladie et inhibe l'infiltration des leucocytes au niveau de l'épithélium.^{259, 260} Par ailleurs, le blocage du CD40L quatre semaines suivant le déclenchement du modèle expérimental pathologique chez la souris, améliore significativement les complications associées à cette complication (maladie inflammatoire de l'intestin), sans toutefois l'irradier totalement.²⁶⁰ De plus, les souris transgéniques surexprimant le CD40L démontrent une infiltration leucocytaire importante au niveau de plusieurs organes et développent une forme létale de la maladie dès l'âge de 3-6 semaines.²⁶¹ Finalement, dans une petite étude clinique, l'administration d'un antagoniste spécifique du CD40L chez des patients atteints de la maladie de Crohn, montra des effets bénéfiques importants, avec 77% des patients répondant bien au traitement et 22% des patients entrant en rémission de la maladie.²⁶²

1.6.3.6 L'arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une inflammation chronique des articulations affectant 1% de la population mondiale.²⁶³ Comme pour la plupart des maladies auto-immunes, elle est caractérisée par une infiltration des cellules immunitaires au niveau des articulations, causant ainsi une

augmentation locale de cytokines, chimiokines et métalloprotéinases. On dénote aussi une prolifération des cellules synoviales, ce qui mène ultimement à l'apaisement du synovium et à la dégradation du cartilage et des os.²⁶³

L'activation du CD40 des fibroblastes synoviaux mène à la relâche des cytokines IL-8, IL-15, IL-17, TNF et MCP-1 qui potentiellement contribuent à la destruction du joint.^{264, 265} De plus, il fut démontré que la liaison du CD40 sur ces cellules favorise l'expression membranaire du ligand de RANK, une molécule impliqué dans l'activation des ostéoclastes et dans la résorption de l'os.²⁶⁶ Par ailleurs, le CD40L des cellules sanguines périphériques et des lymphocytes T synoviaux des patients souffrants de l'arthrite rhumatoïde est significativement surexprimé à la surface de ces cellules, comparativement aux cellules de patients contrôles. Ceci mène à une augmentation accrue d'immunoglobulines par les lymphocytes B et à une sécrétion exagérée de l'IL-2 par les cellules dendritiques synoviales.²⁶⁷⁻²⁷⁰ D'ailleurs, la surexpression du CD40L sur les lymphocytes T corrèle avec une augmentation de l'activité des mécanismes physiopathologiques de la maladie.²⁷¹

Chez la souris, l'administration d'un anticorps anti-CD40L avant l'initiation de l'arthrite induite par le collagène (modèle d'arthrite expérimentale chez la souris), prévient ou améliore du moins la maladie. Par contre, l'administration de ce même traitement une fois l'arthrite débuté, ne semble pas renverser ou stabiliser les complications déjà présentes, ce qui signifie que le système CD40/CD40L occupe un rôle important dans les phases inflammatoires initiales de l'arthrite.^{272, 273}

Plusieurs associations génétiques entre le complexe CD40/CD40L et l'arthrite rhumatoïde ont été identifiées. Récemment, un polymorphisme nucléotidique au niveau du gène du CD40 fut associé avec l'incidence de l'arthrite rhumatoïde auprès de patients européens.²⁷⁴ De plus, cette étude identifia d'autres polymorphismes génétiques au niveau de certaines protéines signalétiques impliquées dans l'activation du CD40, telle que la protéine inductible-3 alpha ("Alpha-Induced Protein 3", AIP3) du TNF et TRAF-1. Nous ne savons toujours pas, par contre, l'effet de ces polymorphismes sur les niveaux d'expression ou la fonction de ces protéines (CD40, AIP3 et TRAF-1).

1.6.3.7 Le lupus érythémateux disséminé

Le lupus érythémateux disséminé est une maladie systémique auto-immune chronique dans laquelle on dénote la présence d'anticorps circulants s'attaquant à l'ADN et à d'autres composantes nucléaires des cellules du tissu conjonctif.²⁷⁵ Cette maladie affecte en général plusieurs organes importants, incluant la peau, les joints, les poumons, le cerveau, le cœur et les reins.

Les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ de patients atteints de la maladie contiennent significativement plus de CD40L membranaire que ceux de patients contrôles. Étonnement, les monocytes et lymphocytes B de ces mêmes patients, expriment aussi de hauts niveaux de CD40L, contrairement aux cellules normales qui contiennent en grande majorité le CD40.²⁷⁶⁻²⁷⁹ D'ailleurs, les souris transgéniques génétiquement modifiées afin d'exprimer de hauts niveaux de CD40L au niveau des cellules B, développent une forme de maladie bien similaire au lupus érythémateux disséminé, soulignant ainsi l'importance de cette expression cellulaire ectopique dans la pathogénèse de cette maladie auto-immune.²⁸⁰ De plus, il existe une corrélation positive entre les niveaux circulants du sCD40L chez les patients atteints du lupus et le degré de sévérité de la maladie.²⁸¹ Les patients souffrants du lupus érythémateux disséminé démontrent une diminution significative du nombre de cellules progénitrices $CD34^+$ retrouvées dans la moelle osseuse et une prédisposition à l'apoptose cellulaire au niveau de ces cellules. Parallèlement, il fut démontré que la liaison du CD40 des cellules $CD34^+$ déclenche l'apoptose de ces cellules, ce qui explique potentiellement les bas niveaux de cellules $CD34^+$ retrouvées chez les patients atteints du lupus.²⁸²

Dans un modèle expérimental du lupus érythémateux disséminé chez la souris, l'administration d'un anticorps anti-CD40L prévient ou améliore du moins les complications pathologiques associées à la maladie. Par exemple, ces animaux démontrent une protection contre l'insuffisance rénale et contiennent significativement moins d'anticorps anti-ADN. De plus, l'administration de l'anticorps une fois les complications manifestées, prolonge la durée de vie des animaux et améliore la fonction rénale.²⁸³⁻²⁸⁶

Comme pour plusieurs autres complications auto-immunes, l'association entre certains polymorphismes génétiques et l'incidence de la maladie, fut identifiée. Premièrement, le gène du CD40 se retrouve au niveau du chromosome 20q11.2-13.1, une région identifiée comme un lien potentiel à l'incidence du lupus.^{275, 287} Deuxièmement, le polymorphisme nucléotidique nommé

rs11086998 G, résultant de la substitution d'une proline pour une alanine à l'acide aminé 227 de la séquence du CD40, augmente la sévérité de la maladie du lupus érythémateux disséminé, surtout auprès de patients d'origine hispanique.²⁸⁸

1.6.4 Le CD40L soluble et les syndromes cardiovasculaires cliniques

Étant donné la contribution importante de l'axe CD40/CD40L dans l'athérosclérose, plusieurs études cliniques ont évalué la relation entre les niveaux circulants de sCD40L et l'incidence de plusieurs syndromes cardiovasculaires, en particulier les ACS, tels que l'infarctus du myocarde aigu et l'angine instable, et les syndromes coronariens stables, tels que l'angine stable et la maladie coronarienne stable.

Premièrement, plusieurs études ont mesuré les niveaux plasmatiques de sCD40L chez les patients atteints de ces syndromes, sans toutefois faire le lien entre les niveaux de la molécule et la sévérité ou le pronostic de la maladie. En général, ces études démontrent que les patients souffrant des ACS et des syndromes coronariens stables contiennent de hauts niveaux de sCD40L circulants. Par exemple, les patients souffrant de l'infarctus du myocarde aigu et de l'angine instable présentent des niveaux plasmatiques de la molécule significativement supérieure aux patients contrôles. De plus, l'augmentation plasmatique du sCD40L semble être indépendante des autres marqueurs inflammatoires importants, tels que l'IL-6, sICAM-1, sVCAM-1, le CRP et la troponine, ce qui fait de lui un facteur de risque des événements cardiovasculaires plus fiables que les autres.^{289, 290} Puisque la forme soluble du CD40L en circulation provient presque exclusivement des plaquettes activées,²⁰ il semble que cette augmentation observée en clinique provient d'une activation plaquettaire accrue et non du degré d'inflammation en général. Le tableau 1.3 résume les principales études cliniques importantes ayant identifiées les niveaux de sCD40L plasmatiques dans les ACS et les syndromes coronariens stables.

Tableau 1.3 : Le CD40L soluble dans les ACS et les syndromes coronariens stables

Syndrome (s)	Patients (#)	Niveaux de sCD40L (vs contrôle)	Référence
Infarctus du myocarde aigue	219 patients 389 contrôles	↑	Antoniades et al ²⁹¹
Angine instable	26 patients 19 contrôles	↑	Aukrust et al ²⁹²
Infarctus du myocarde aigue Angine instable	15 patients IMA 25 patients AI 12 contrôles	↑ ↑	Garlichs et al ²⁹³
Infarctus du myocarde aigue Maladie coronarienne stable	109 patients IMA 209 patients MCS 286 contrôles	↑ -	Tousoulis et al ²⁹⁴
Maladie coronarienne stable	204 patients 189 contrôles	↑	Tayebjee et al ²⁹⁵
Infarctus du myocarde aigue	130 patientes (femmes) 130 contrôles (femmes)	↑	Schönbeck et al ²⁹⁶

Deuxièmement, plusieurs études cliniques ont évalué la corrélation entre les niveaux plasmatiques de sCD40L et le pronostic ou le risque de complications associées à la maladie. Certes, la plus grosse étude clinique provient du groupe de Heeschen et al. (Étude CAPTURE), publiée en 2003 auprès de 1088 patients souffrants des ACS.¹² Ces derniers démontrèrent que les patients contenant de hauts niveaux de sCD40L étaient à haut risque de décès (trois fois plus à risque que les patients contrôles), suite à des complications cardiovasculaires, tels que l'infarctus du myocarde aigu. Par ailleurs, dans l'étude MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering), des hauts niveaux de sCD40L représentent un facteur de risque indépendant pour l'incidence d'événements cardiovasculaires récurrents.²⁹⁷ De plus, les individus qui expriment le polymorphisme nucléotidique -3459A>G au niveau du gène du CD40L sont à haut risque de développer l'infarctus du myocarde aigu.²⁹⁸

L'association entre les niveaux de sCD40L plasmatiques et l'incidence des syndromes cardiovasculaires pointe vers l'importance du complexe CD40/CD40L dans les maladies inflammatoires vasculaires. Cependant, il n'est pas encore clair si l'augmentation du sCD40L circulant dans ces syndromes représente une conséquence d'un état élevé d'activation plaquettaire observé chez ces patients ou si ce phénomène représente plutôt une cause du développement et des complications de ces maladies. Certes, plus d'études à ce sujet seront nécessaires afin de mieux clarifier cette problématique.

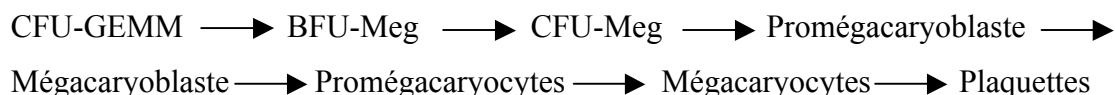
Chapitre 2

Les Plaquettes

2.1 Origine et structure des plaquettes

Les plaquettes furent découvertes en 1882 par le chercheur italien Giulio Bizzozero.²⁹⁹ Il fut le premier à les identifier anatomiquement en plus de leur attribuer un rôle dans l'hémostase et la thrombose vasculaire.³⁰⁰ Bizzozero fut aussi le premier à identifier les mégacaryocytes issus de la moelle osseuse, tout en ignorant que ces dernières étaient les cellules précurseurs des plaquettes. À l'heure actuelle, les plaquettes occupent une place primordiale dans l'hémostase physiologique mais aussi dans plusieurs conditions pathologiques, comme la thrombose vasculaire, l'athérosclérose, l'inflammation, l'immunité, l'oncologie, les maladies coronariennes, les accidents cérébraux vasculaires, le diabète, la glomérulonéphrite rénale, les maladies psychiatriques, et autres.

Les plaquettes sont des cellules anucléées issues de cellules hautement spécialisées, nommées les mégacaryocytes, qui se développent à partir d'une cellule souche pluripotente, selon le modèle hématopoïétique suivant :³⁰¹



CFU-GEMM: "*colony-forming unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte*"

BFU-Meg: "*burst-forming unit megakaryocyte*"

CFU-Meg: "*colony-forming unit megakaryocyte*"

Les mécanismes par lesquels les mégacaryocytes donnent naissance aux plaquettes ont longtemps fasciné chercheurs et hématologistes à travers le monde. À ce jour, trois modèles ont été proposés : le modèle de la défragmentation cytoplasmique, celui du bourgeonnement membranaire et celui de la formation pro-plaquettaire (Figure 2.1). Au cours de la défragmentation cytoplasmique, des plaquettes matures seraient pré-assemblées dans le cytoplasme de la cellule mégacaryocytaire. Les plaquettes seraient, par la suite, relâchées dans le milieu extracellulaire suite à une défragmentation cytoplasmique.^{302, 303} Dans le modèle du bourgeonnement membranaire, les plaquettes seraient attachées à la membrane des mégacaryocytes, puis, par la suite, clivées de la périphérie et relâchées dans la circulation.^{304, 305} Finalement, les données expérimentales acquises au cours des années favorisent le modèle de la formation pro-plaquettaire, dans lequel les mégacaryocytes formeraient de longues extensions

cytoplasmiques, au bout desquelles reposeraient des pseudo-plaquettes ou pro-plaquettes en forme de perles.^{306, 307}

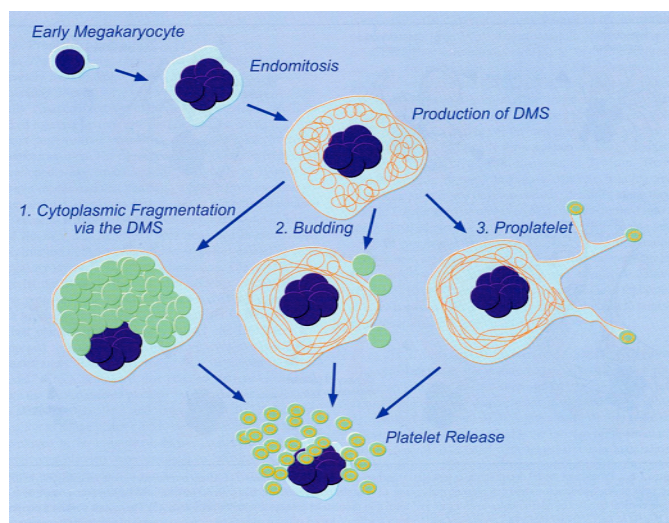


Figure 2.1: Les trois modèles proposés pour la production de plaquettes à partir des mégacaryocytes. Michelson A.D. (2007). *Platelets*. Second Edition. Burlington : Academic Press. pp. 28.

Les plaquettes circulent dans le sang sous forme discoïde ayant une dimension de $3 \times 0.5 \mu\text{m}$. La demi-vie des plaquettes est d'environ 7 jours et leur élimination s'effectue au niveau du foie et de la rate, et parfois même par le système réticulo-endothélial.³⁰⁸ Les plaquettes sont dépourvues de noyau et leur contenu cytoplasmique se limite principalement à un nombre important de granules spécifiques, ainsi qu'à des organelles cellulaires typiques, telles que des mitochondries, des lysosomes et des membranes résiduelles du réticulum endoplasmique.³⁰⁸ La structure des plaquettes peut être divisée en trois composantes essentielles soit, la membrane, le cytosquelette et les granules de sécrétion.

La membrane plasmique des plaquettes est lisse et ne présente que quelques invaginations membranaires formant ce qu'on appelle le système caniculaire ouvert (*open canicular système*). Ces invaginations représentent un système de conduit élaboré permettant l'entrée de petites molécules à l'intérieur de la cellule. Au cours de l'activation plaquettaire, le système caniculaire ouvert sert de conduit membranaire par lequel les granules cytoplasmiques s'y fusionnent et déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire. Comme pour toute autre cellule, la membrane plasmique des plaquettes constitue aussi un lieu d'ancrage pour une variété de récepteurs et de molécules d'adhésion essentielles au fonctionnement de la cellule.³⁰⁹

Le cytosquelette plaquettaire est une composante intégrale de la cellule, puisqu'il confère aux plaquettes leur forme, leur permet de résister aux forces de cisaillement générées par le débit sanguin, permet l'ancrage de différentes glycoprotéines membranaires et représente le siège d'une multitude de réactions biochimiques impliquées dans l'activation plaquettaire.³¹⁰ Le cytosquelette des plaquettes est formé de trois couches : le cytosquelette membranaire à base de spectrine, le cytosquelette cytoplasmique formé d'un réseau de filament d'actine et d'une couche unique de microtubule enroulé sous la membrane plasmique (figure 2.2).³¹¹⁻³¹³ Au cours de l'activation plaquettaire, on peut observer une réorganisation du cytosquelette, ce qui engendre un changement de forme des plaquettes; d'une forme discoïde à une forme sphérique dotée de filopodes.^{314, 315}

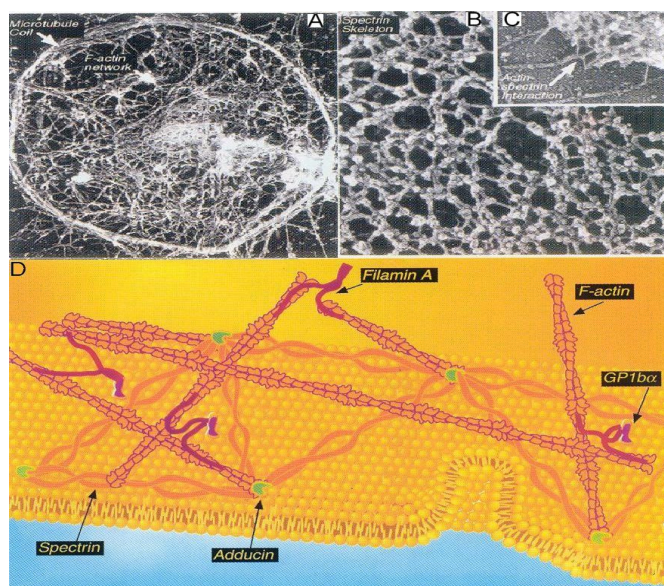


Figure 2.2: Structure du cytosquelette plaquettaire. A) Le cytosquelette cytoplasmique, formé par les filaments d'actine, est entouré par une monocouche microtubulaire retrouvée sous la membrane plasmique. B) Structure du cytosquelette membranaire à base de spectrine. C) Interaction entre la spectrine du cytosquelette membranaire et les filaments d'actine. D) Schématisation du cytosquelette cytoplasmique et membranaire des plaquettes avec leurs composantes principales. Michelson A.D. (2007). *Platelets*. Second Edition. Burlington : Academic Press. pp. 76.

Le cytoplasme des plaquettes est majoritairement occupé par un nombre important de granules de sécrétion (voir section 2.3.3 de ce chapitre). Il existe trois types de granules plaquettaires; les granules alpha, les granules denses et les lysosomes. Ces granules renferment une multitude de substances indispensables au processus de l'activation, de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire.

2.2 Molécules d'adhésion plaquettaire

Puisque la fonction première des plaquettes est l'hémostase, il n'est pas surprenant que ces éléments sanguins soient dotés d'une multitude de récepteurs adhésifs (molécules d'adhésion), leur permettant d'adhérer à l'endothélium, à la matrice sous-endothéliale et avec d'autres plaquettes afin de former un clou hémostatique. L'analyse des différentes molécules d'adhésion plaquettaire a permis une compréhension plus approfondie du rôle et des mécanismes exacts par lesquelles les plaquettes participent à l'hémostase physiologique, mais aussi à la thrombose pathologique.

Les molécules d'adhésion plaquettaire peuvent être classées en quatre grandes catégories : les intégrines, les immunoglobulines, les sélectines et les sialomucines. La famille des intégrines comprend l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa), l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (récepteur de la vitronectine), l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ (récepteur de la fibronectine) et l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ (récepteur de la laminine). Parmi les immunoglobulines, on retrouve la glycoprotéine VI (GPVI), les récepteurs Fc (Fc γ RIIA et Fc ϵ RI), ICAM-2 et PECAM-1. Parmi la famille des sélectines, seule la P-sélectine est retrouvée dans les plaquettes. Finalement, le complexe GPIb-IX-V est le seul récepteur adhésif faisant partie de la famille des sialomucines. Seules les molécules d'adhésion les plus importantes seront discutées dans cette section.

2.2.1 La GPVI

La GPVI est l'une des plus importantes molécules d'adhésion plaquettaire et constitue, avec l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, un des deux récepteurs majeurs pour le collagène. La découverte de ce récepteur vint à la suite d'études effectuées auprès de patients montrant une absence totale de réactivité plaquettaire suite à une stimulation au collagène.³¹⁶⁻³¹⁸ Des analyses auprès du sérum de ces patients ont révélé la présence d'anticorps dirigés contre une protéine de poids moléculaire de 60 kDa, clonée quelques années plus tard comme le récepteur GPVI.³¹⁹ GPVI est un récepteur faisant partie de la famille des immunoglobulines et forme un complexe membranaire avec la chaîne Fc γ , cette dernière étant cruciale pour l'activation et la signalisation enclenchée par ce récepteur.^{320, 321} La portion extracellulaire du récepteur comprend deux boucles C2 contenant les domaines d'interaction au collagène (Figure 2.3).

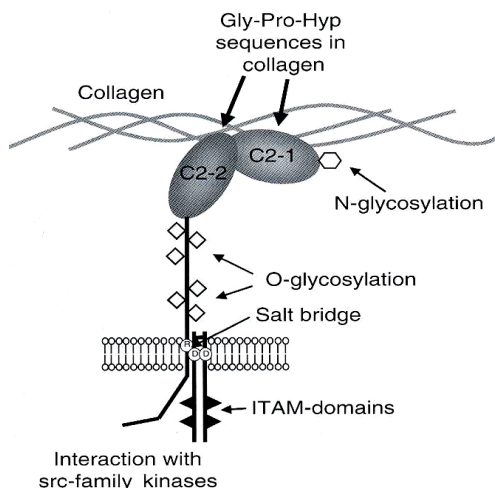


Figure 2.3: Structure de la GPII. Michelson A.D. (2007). *Platelets*. Second Edition. Burlington : Academic Press. pp. 124.

Les sites d'interaction exacts avec le collagène n'ont pas encore été clairement identifiés, mais il semble que la boucle C2-1 y soit majoritairement impliquée.^{322, 323} Les deux boucles C2 reposent sur une structure fortement glycosylée, ce qui permet aux deux domaines de reconnaissance de s'étendre loin de la membrane afin d'augmenter l'accessibilité au collagène. La région cytoplasmique de GPII comprend deux domaines à motifs activateurs d'immunorécepteurs à base de tyrosine ("Immunoreceptor Tyrosine-based Activatory Motifs", ITAM) qui, suite à l'activation du récepteur, se retrouvent phosphorylés par la famille des tyrosine kinases Src.³²⁴

Il est clair que la GPII constitue un récepteur majeur pour le collagène, mais son implication physiologique exacte dans la fonction plaquettaire est encore débattue. Il a été démontré que la formation du thrombus plaquettaire, *in vivo*, est largement dépendante du récepteur GPII.³²⁵⁻³²⁷ De plus, il semble que la GPII soit partiellement impliqué dans l'adhésion des plaquettes sur des surfaces de collagène; l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ étant l'autre récepteur jouant un rôle important dans ce phénomène.^{326, 328} Cependant, la GPII occupe une place encore plus importante dans le processus de l'agrégation plaquettaire induite par le collagène où elle remplit une fonction indispensable.³¹⁶⁻³¹⁸

2.2.2 L'intégrine $\alpha_2\beta_1$

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIIa/IIb) est le deuxième récepteur pour le collagène et constitue la deuxième plus importante intégrine à la surface des plaquettes, après l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. On retrouve entre

2000 et 4000 copies de cette molécule sur les plaquettes et son rôle principal se limite à l'adhésion des plaquettes au collagène de la matrice extracellulaire.³²⁹⁻³³¹ À ce jour, deux sites de reconnaissance pour le collagène ont été identifiés sur l'intégrine $\alpha_2\beta_1$, soit le domaine I de la sous-unité α_2 et le domaine I apparenté de la sous-unité β_1 .^{332, 333} Le domaine I de la sous-unité α_2 possède aussi un site de reconnaissance pour des ions magnésium (Mg^{2+}) et cette interaction semble être requise pour l'adhésion du collagène au récepteur.³³⁴

Il est bien établi que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est essentielle à l'adhésion des plaquettes aux surfaces endommagées. Par contre, il semblerait que sous condition de hautes forces de cisaillement, l'adhésion plaquettaire dépendrait de l'interaction GPIb/collagène, par l'intermédiaire du facteur von Willebrand ("von Willebrand Factor", vWF).³³⁵ De plus, même si l'agrégation plaquettaire au collagène est fortement dépendante de la GPVI, certaines études indiquent que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ participe à l'initiation du processus de l'agrégation plaquettaire.³³⁶

2.2.3 La GPIb/IX/V

La GPIb/IX/V est un récepteur adhésif faisant partie de la famille des sialomucines et représente le deuxième plus abondant (environ 60 000 copies) récepteur à la surface des plaquettes, après l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.³³⁷⁻³³⁹ Cette molécule d'adhésion est retrouvée sous forme d'un complexe membranaire composé de quatre sous-unités distinctes : deux molécules de GPIb α (CD42b), de GPIb β (CD42c) et de GPIX (CD42a), et une molécule de GPV (CD42d).³⁴⁰ Au niveau cytoplasmique, le complexe GPIb/IX/V s'associe avec plusieurs protéines, dont le dimère 14-3-3 ζ , la calmoduline et la filamine A.³⁴¹⁻³⁴³ La région globulaire de la GPIb α est responsable de la presque totalité de la capacité du complexe GPIb/IX/V à interagir avec d'autres protéines. Effectivement, cette région peut lier le vWF, la thrombine, l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18) des leucocytes, la P-sélectine, les facteurs de coagulation XI et XII, et le facteur kininogène de haut poids moléculaire.

En réponse à des forces de cisaillement élevées, l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est sous la dépendance de l'interaction du complexe GPIb/IX/V au vWF. Le vWF circule dans le sang sous une forme inactive, incapable de lier le complexe GPIb/IX/V. Suite à une lésion endothéliale, le vWF se lie au collagène de la matrice sous-endothéliale, pour ensuite interagir avec le complexe GPIb/IX/V, ce qui permet l'adhésion (et ensuite l'agrégation) des plaquettes. La GPIb α possède aussi un site de haute affinité pour la thrombine et il semblerait

que ce complexe soit impliqué dans l'activation plaquettaire à la thrombine.³⁴⁴⁻³⁴⁶ Cependant, ce phénomène est encore débattu, faute de la complexité et du manque de documentation à ce sujet. De plus, le complexe GPIb/IX/V semble être impliqué dans l'adhésion des leucocytes aux plaquettes déjà adhérees, via l'interaction GPIb α plaquettaire et l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ des leucocytes.³⁴⁷ Finalement, il a été démontré que les plaquettes peuvent rouler sur un endothélium activé; phénomène qui serait dépendant de l'interaction du GPIb α des plaquettes avec la P-sélectine de l'endothélium.³⁴⁸ Ce complexe membranaire occupe une place primordiale dans la physiologie des plaquettes, de par ses diverses implications dans l'adhésion, l'activation et même l'agrégation plaquettaire.

2.2.4 L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) est sans doute la glycoprotéine plaquettaire la plus importante. À l'état de repos, environ 80 000 copies sont exprimées à la surface membranaire avec des réserves importantes retrouvées dans les granules α et le système caniculaire ouvert.^{349, 350} L'agrégation plaquettaire est un phénomène adhésif cellulaire au cours duquel plusieurs plaquettes interagissent ensemble afin de former un clou hémostatique. Le contact ferme entre deux plaquettes s'effectue par l'intermédiaire d'un pont fibrinogène établi entre deux molécules de GPIIb/IIIa. Suite à l'activation plaquettaire, ce récepteur change de conformation, lui permettant ainsi de lier le fibrinogène et d'enclencher le processus de l'agrégation.

La sous-unité α_{IIb} (GPIIb) est constituée de deux chaînes peptidiques reliées par un pont disulfure; une chaîne lourde de 125 kDa comprenant quatre sites de liaison pour des ions divalents (Ca^{2+}) et une chaîne légère de 25 kDa incluant le domaine transmembranaire et une courte région cytoplasmique de 26 acides aminés (Figure 2.4).³⁴⁹⁻³⁵² La sous-unité β_3 (GPIIIa) de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est principalement composée de trois domaines majeurs, soit un domaine PSI (plexines, semaphorines et intégrines), un domaine I apparenté, et un domaine apparenté au facteur de croissance épidermique ("Epidermal Growth Factor", EGF).³⁵³ Le domaine PSI comprend une petite séquence de 90 acides aminés localisée à l'extrémité N-terminale de la sous-unité (en aval du domaine I apparenté) et sa fonction est encore mal caractérisée.³⁵⁴ Le domaine I apparenté de la sous-unité β_3 contient deux sites de reconnaissance RGD étant responsable de l'interaction des différents ligands avec le récepteur. Ainsi, les ligands connus de la GPIIb/IIIa, tels le fibrinogène, le vWF, la fibronectine et la vitronectine, possèdent tous une ou plusieurs

séquences RGD (arginine glycine, aspartame) qui sert comme motif de reconnaissance pour le récepteur. Finalement, le domaine EGF apparenté de la sous-unité β_3 est principalement caractérisé par une série de quatre boucles riches en cystéines. Même si cette région n'est pas intégrale à la structure du récepteur et ne possède aucun site de reconnaissance connu, une perturbation (mutation) au niveau de cette région peut enclencher l'activation du récepteur, ce qui suggère que ce domaine possède une activité régulatrice importante au niveau fonctionnel.³⁵⁵⁻³⁵⁸

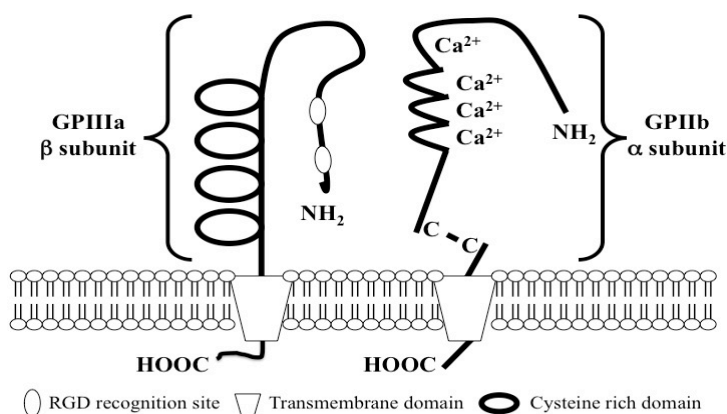


Figure 2.4: Représentation schématique de la structure de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. (Production du Laboratoire du Dr. Merhi)

Le cytosquelette plaquettaire occupe une place primordiale dans la structure et l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Au repos, une bonne partie des molécules de GPIIb/IIIa sont associées au cytosquelette membranaire, ce qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique. Suite à l'activation plaquettaire, la queue cytoplasmique du récepteur s'associe aux filaments d'actine du cytosquelette cytoplasmique.^{359, 360} Cette interaction aurait pour but d'augmenter la résistance des agrégats plaquettaires sous forces de cisaillement élevées, tel qu'observé lors de l'agrégation plaquettaire, puis aussi de réguler l'activation du récepteur suite à la liaison du fibrinogène.³⁶¹ Le rôle exact de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans l'agrégation, mais aussi dans l'adhésion et la signalisation plaquettaire sera discuté plus en détail dans la prochaine section de ce chapitre.

2.2.5 La P-sélectine

La famille des sélectines est composée de trois molécules d'adhésion, la P-sélectine, la L-sélectine et la E-sélectine, identifiées en fonction du tissu où elles furent originellement

caractérisées. La L-sélectine (CD62L) est la plus petite des sélectines et est exprimée constitutivement à la surface des leucocytes; la E-sélectine (CD62E) est retrouvée dans les cellules endothéliales et est redistribuée à la surface membranaire suite à l'activation endothéliale par un mécanisme de synthèse *de novo*; puis la P-sélectine (CD62P) est retrouvée dans les granules α des plaquettes, mais aussi dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales.³⁶²⁻³⁶⁴

Parmi la famille des sélectines, seule la P-sélectine est retrouvée dans les plaquettes. Suite à l'activation plaquettaire, environ 10 000 copies de P-sélectine sont redistribuées des granules cytoplasmiques à la membrane cellulaire.^{365, 366} Cette expression membranaire correspond à une densité d'environ 350 molécules/ μm , soit 10 fois la densité de P-sélectine au niveau des cellules endothéliales.^{367, 368} Environ 30 minutes suivant l'activation cellulaire, les mécanismes de désensibilisation cellulaire s'enclenchent et la teneur membranaire en P-sélectine diminue considérablement, soit par un mécanisme d'internalisation membranaire ou par un clivage enzymatique.³⁶⁹⁻³⁷³

Les sélectines partagent tous une structure membranaire commune. La région extracellulaire de la molécule est principalement constituée de trois domaines distincts; soit une séquence de taille variable à région consensus répétitive, un domaine structural EGF et un domaine lectine à dépendance calcique, responsable de l'adhésion et de la liaison du récepteur à ses ligands (Figure 2.5). De plus, chacune des sélectines est composée d'un domaine hydrophobique transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique.³⁷⁴ La principale différence entre les sélectines réside dans la taille de la région consensus. Par exemple, pour la P-sélectine, cette région est caractérisée par une séquence de 9 régions répétitives, ce qui lui confère le titre de la plus grande des sélectines.

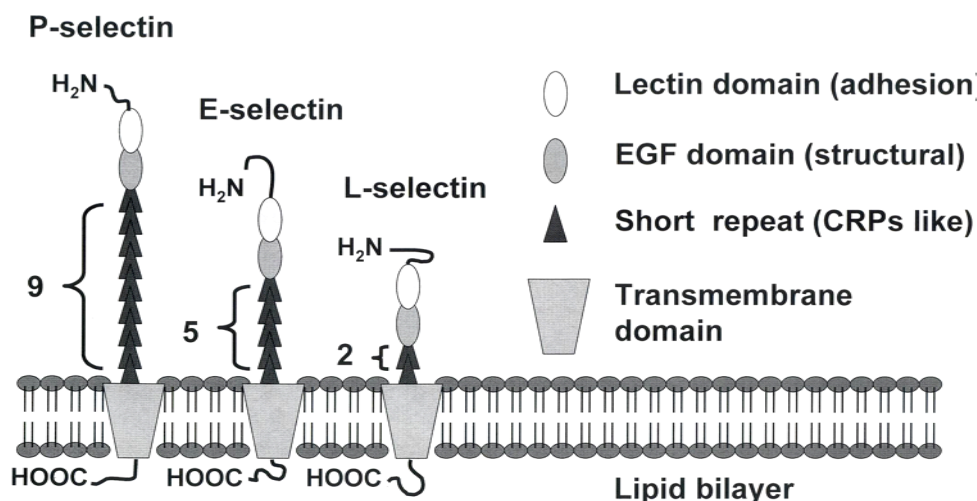


Figure 2.5: La famille des sélectines. (Production du Laboratoire du Dr. Merhi)

Une des fonctions importantes de la P-sélectine est son implication dans les interactions adhésives entre les plaquettes et les leucocytes. Il est bien établi, depuis plusieurs années, que les leucocytes participent activement aux réactions thrombo-inflammatoires par le biais de leurs interactions avec les plaquettes aux sites de lésions thrombotiques. Ce recrutement secondaire s'effectue majoritairement par la liaison de la P-sélectine à son ligand de haute affinité, le ligand-1 glycoprotéique de la P-sélectine ("P-selectin glycoprotein ligand-1", PSGL-1), exprimé constitutivement à la surface des leucocytes.³⁷⁴⁻³⁷⁶ Ce phénomène adhésif est d'une grande importance physiologique, mais il occupe aussi un rôle de premier plan dans de nombreuses pathologies, telles la resténose, l'athéromatose, et toutes autres complications thrombo-inflammatoires.³⁷⁷⁻³⁸¹

Par ailleurs, la P-sélectine occupe aussi un rôle important dans les interactions plaquettes/plaquettes, tel que témoigné par son implication dans la stabilité de l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus *in vivo*. Le ligand de la P-sélectine à la surface des plaquettes est encore débattu, mais il semble que les sulfatides membranaires et le complexe GPIb/IX/V pourraient constituer des récepteurs cibles.³⁸²

2.3 Fonction plaquettaire

La fonction première des plaquettes est le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins, soit l'hémostase. Suite à un endommagement vasculaire, les plaquettes doivent rapidement former un

clou hémostatique afin de corriger toute fuite ou écoulement sanguin pouvant nuire au fonctionnement normal du corps humain. Afin d'accomplir cette tâche les plaquettes suivent une cascade d'événements bien précise qui consiste essentiellement à l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire.^{383, 384} Ces mécanismes cellulaires sont principalement régis par une série de molécules d'adhésion, soient la GPIb/IX/V, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), la GPVI et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) pour l'adhésion et l'activation cellulaire, et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) pour l'agrégation plaquettaire et la stabilisation du thrombus, par l'entremise de la signalisation "*outside-in*", issue de la liaison du fibrinogène à cette dernière.

2.3.1 Adhésion plaquettaire

L'adhésion plaquettaire est la première étape de l'hémostase et elle est enclenchée suite à une lésion ou un endommagement vasculaire. Sous conditions physiologiques normales, soit lorsque la paroi des vaisseaux est intacte, les plaquettes circulent librement dans le sang sans être capables d'adhérer. D'ailleurs, la cellule endothéliale exerce un rôle inhibiteur important sur l'activité plaquettaire, de par sa capacité à sécréter diverses substances inhibitrices, telles le NO, la prostacycline et la NTPDase1 (CD39).^{385, 386} Suite à une lésion endothéliale, les composantes de la matrice extracellulaire, comme le collagène, sont exposées à la lumière du vaisseau et les plaquettes peuvent, par la suite, entrer en contact avec ces composantes et adhérer fermement aux sites de lésion. Le processus de l'adhésion plaquettaire peut être divisé en deux étapes, soit le roulement des plaquettes sur l'endothélium activé et l'adhésion des plaquettes aux surfaces de la matrice sous-endothéliale.

Roulement des plaquettes sur l'endothélium activé

Comme pour les leucocytes au cours de l'inflammation, il a été démontré que les plaquettes peuvent rouler sur un endothélium activé; phénomène qui serait totalement dépendant de la P-sélectine endothéliale.³⁸⁷ Cette étape serait la toute première de l'hémostase et permettrait le ralentissement séquentiel des plaquettes en circulation avant leur adhésion sur les surfaces de la matrice sous-endothéliale. À la recherche du ligand de la P-sélectine à la surface des plaquettes, deux candidats ont été proposés : le ligand de haute affinité de la P-sélectine, le PSGL-1, et le complexe GPIb/IX/V.^{348, 388}

Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale

L'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale est possible grâce à la participation de quatre molécules d'adhésion plaquettaire principales; la GPIb/IX/V, l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (GPIa/IIa), la GPVI et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Suite à l'exposition des composantes de la matrice sous-endothéliale, les molécules de vWF en circulation dans le sang adhèrent au collagène présent à la surface sous-endothéliale. Cette adhésion déclenche un changement de conformation au niveau des molécules du vWF, les rendant ainsi aptes à lier le complexe GPIb/IX/V plaquettaire, ce qui permet une adhésion de faible intensité.³⁸⁹⁻³⁹² Cette interaction représente un contact plus ou moins ferme entre les plaquettes et la matrice, mais demeure absolument essentielle, puisqu'elle permet le ralentissement des plaquettes et la liaison subséquente de la GPIa/IIa et du GPVI plaquettaire aux fibres de collagène libre de la matrice.^{393, 394} Ce dernier contact est de nature ferme et assure une immobilisation complète des plaquettes sur la surface endommagée. L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ participe aussi à l'adhésion ferme des plaquettes à la matrice, par l'entremise de son interaction avec le fibrinogène et le vWf, tous deux présents au niveau de l'espace sous-endothéliale.

Malgré que toutes ces molécules d'adhésion occupent une place importante dans l'adhésion plaquettaire, les forces de cisaillement vasculaires semblent prédéterminer le degré d'importance de chacune de celles-ci. Par exemple, à haute force de cisaillement, tel qu'observé dans les artères sténosées, la participation du complexe GPIb/IX/V devient absolument essentielle, tandis que celle de la GPIa/IIa et du GPVI demeure importante, mais moins cruciale. Par ailleurs, lorsque les forces de cisaillement sont faibles (réseau veineux), ces molécules d'adhésion occupent un rôle inversé.³³⁵ La figure 2.6 résume les principales étapes de l'adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale.

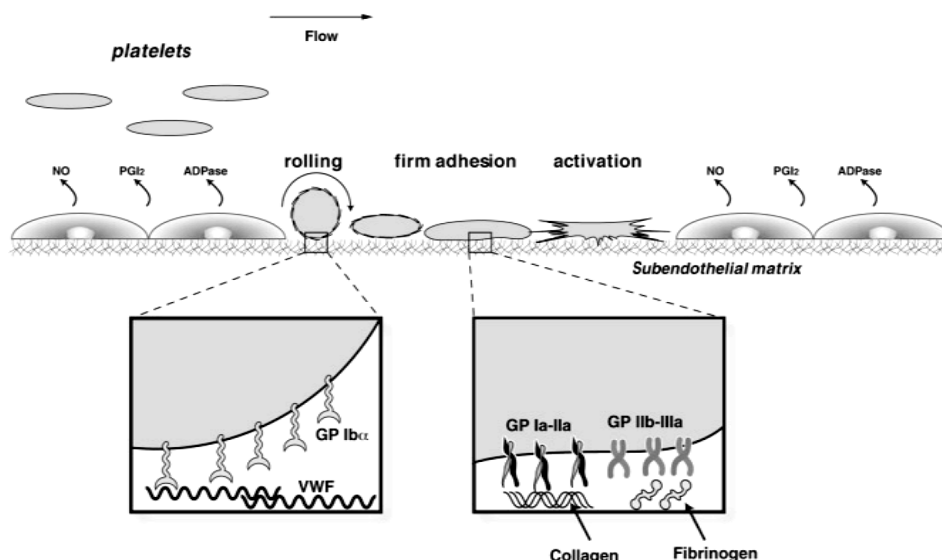


Figure 2.6 : Adhésion des plaquettes à la matrice sous-endothéliale. En condition basale, l'endothélium sécrète des substances qui refoulent l'adhésion des plaquettes à la matrice. Suite à un endommagement vasculaire, les plaquettes reconnaissent certaines composantes clés de la matrice-extracellulaire, tels que le collagène, le vWF et le fibrinogène, leur permettant ainsi d'adhérer au niveau de la lésion. Voir texte pour les différentes molécules d'adhésion impliquées. Conde I.D. et al. *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. 2003; 60:236-246.

2.3.2 Activation plaquettaire

Les interactions de premier (GPIb/IX/V/vWF) et second (GPIIa/IIa et GPVI/collagène, ainsi que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ /vWF et fibrinogène) contact entre les plaquettes et la matrice sous-endothéliale permettent non seulement l'adhésion des plaquettes, mais aussi leur activation. Effectivement, suite à leur adhésion aux surfaces endommagées, les plaquettes changent rapidement de forme, sécrètent maintes substances facilitant l'arrivée et le recrutement de plaquettes supplémentaires et déclenchent l'activation de récepteurs et molécules d'adhésion essentielles à la formation d'un agrégat plaquettaire, telle l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{395, 396} Le premier signe de l'activation plaquettaire est marqué par le changement de forme, soit d'une forme discoïde à une forme sphérique avec la présence d'extension membranaire nommée les filopodes (Figure 2.7). Ce changement morphologique permet aux plaquettes de s'étaler et de s'étendre sur les surfaces endommagées afin de couvrir une meilleure superficie. Le changement de forme plaquettaire est dépendant de la réorganisation structurale des filaments d'actine du réseau du cytosquelette cytoplasmique.^{314, 315}

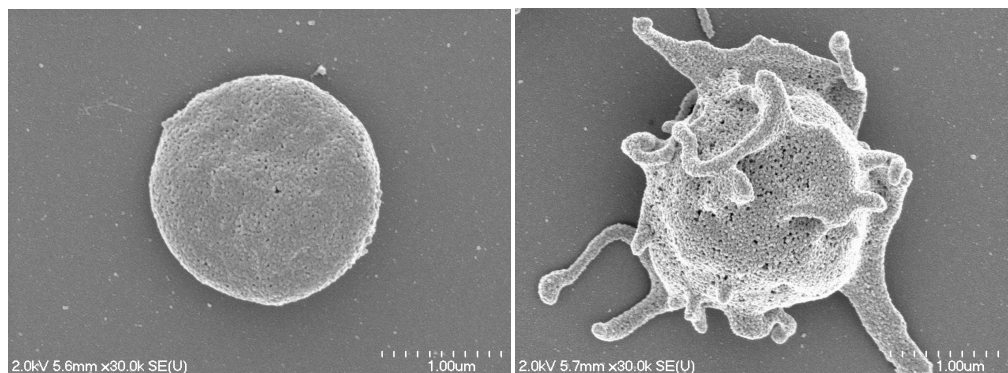


Figure 2.7 : Images par microscopie électronique à balayage du changement de forme plaquettaire. Gauche : Plaquette au repos ; Droite : Plaquette activée. Images tirées du laboratoire du Dr. Merhi.

L'activation plaquettaire engendre, par la suite, la sécrétion de substances activatrices impliquées dans le recrutement additionnel de plaquettes aux sites de lésion. L'adénosine diphosphate ("Adenosine Diphosphate", ADP) et la thromboxane A₂ ("Thromboxane A₂", TXA₂) font, par exemple, partie de substances sécrétées par les plaquettes lors de leur activation (la prochaine section de ce chapitre portera sur la sécrétion plaquettaire). Finalement, l'activation des molécules d'adhésion plaquettaire, telle l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et la P-sélectine, est aussi un phénomène cellulaire clé de l'activation des plaquettes.

Les différents événements cellulaires observés au cours de l'activation plaquettaire sont possibles grâce à une série de cascade de signaux intracellulaires déclenchés suite à la stimulation des plaquettes via leurs différents récepteurs membranaires.³⁹⁶ L'intégration des différents signaux perçus par les récepteurs membranaires se traduit par la génération de seconds messagers. Il existe deux voies principales de signalisation intracellulaire dans les plaquettes, soit la voie de signalisation activée par la PLC qui génère le diacylglycérol ("Diacylglycerol", DAG) et le Ca²⁺, et active subséquentement les protéines kinases C ("Protein Kinase C", PKC), et celle générée par l'activation de l'adénylate cyclase et des protéines G.

Les récepteurs à la thrombine (PAR1 et PAR4) et aux médiateurs secondaires, tels que l'ADP (récepteurs P2Y1 et P2Y12) et la TXA₂ (récepteur TP), sont couplés aux protéines G. PAR1, PAR4 et le récepteur TP sont couplés aux protéines G_q et G_{12/13}, tandis que le récepteur P2Y1 n'est couplé qu'à G_q. La voie G_q mène à l'activation de la PLC β , ce qui active subséquentement les PKC et libère le Ca²⁺ intracellulaire. La voie G_{12/13} favorise l'activation des petites protéines de la famille GTPase, telles que RhoA, Rac1 et Cdc42. Ces dernières sont spécifiquement impliquées dans le changement de forme plaquettaire.³⁹⁷

Les récepteurs au collagène (GPVI et GPIa/IIa), ainsi que le récepteur au vWF (le complexe GPIb/IX/V), sont couplés au récepteur Fc (sauf pour la GPIa/IIa) et aux tyrosines kinases Src. Ces récepteurs favorisent aussi l'activation des PKC et la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, mais plutôt par l'entremise de la voie de la PLC γ 2. La liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ active aussi la voie des tyrosines kinases Src et de la PLC γ 2, en collaboration avec l'association de la taline à la queue cytoplasmique de la sous-unité β_3 du récepteur.³⁹⁷

Bref, l'activation de ces voies signalétiques mène ultimement au changement de forme, à la sécrétion et à l'agrégation plaquettaire. La figure 2.8 illustre les principales voies de signalisation impliquées dans l'activation des plaquettes.

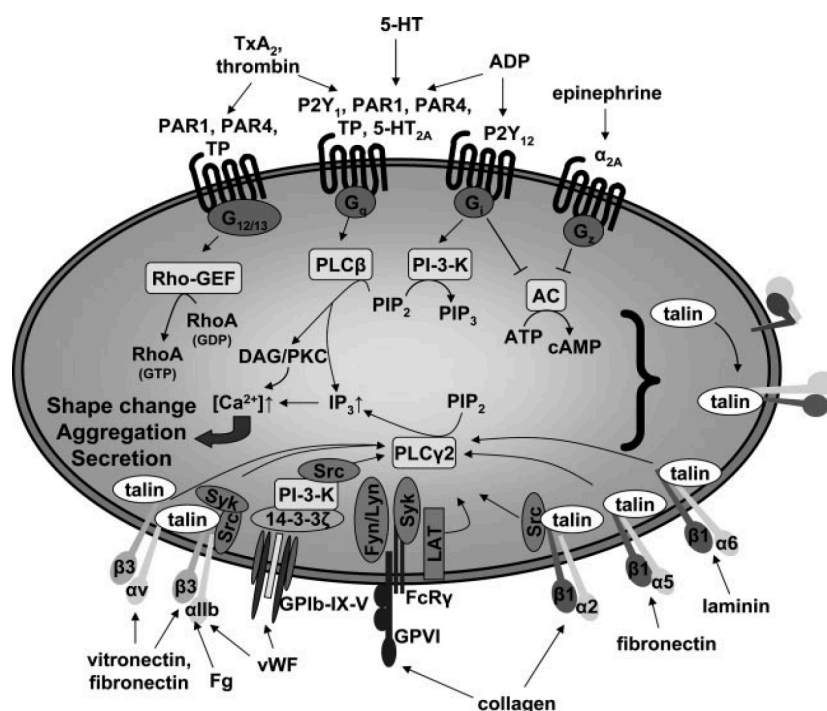


Figure 2.8 : Les principales voies signalétiques impliquées dans l'activation plaquettaire. Szabo DV. et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28:403-412.

2.3.3 Sécrétion plaquettaire

La sécrétion plaquettaire constitue une étape indispensable de l'activation et de la fonction plaquettaire. Les granules de sécrétion des plaquettes contiennent des facteurs de croissance, des protéines impliquées dans la cascade de coagulation, des molécules d'adhésion, des cytokines inflammatoires, des facteurs angiogéniques, et maintes autres substances jouant un rôle primordial dans la physiopathologie plaquettaire. Toutes ces molécules sont synthétisées dans les mégacaryocytes puis, par la suite, entreposées dans des granules spécialisées. Au cours de

l'activation plaquettaire, ces granules font fusion avec la membrane plasmique et déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire par exocytose.

Les plaquettes contiennent trois types de granules spécialisées; les granules alpha, les granules denses et les lysosomes. Les granules alpha sont les plus volumineuses et les plus nombreuses granules plaquettaires, avec approximativement 80 granules alpha par plaquette.³⁹⁸ Elles contiennent principalement des facteurs de croissance, des molécules d'adhésion et des protéines impliquées dans la coagulation. Les granules denses sont beaucoup moins nombreuses que les granules alpha (environ 7 granules par plaquettes), mais contiennent, par contre, des substances indispensables à l'activation plaquettaire, telles l'ADP et la sérotonine.^{399, 400} Finalement, les lysosomes renferment des enzymes jouant un rôle dans la dégradation et la digestion de différentes protéines.^{401, 402} Le tableau 1.2 résume les principaux constituants des trois types de granules plaquettaires.

Tableau 2.1: Principaux constituants des granules plaquettaires

Granules alpha	Granules denses	Lysosomes
P-sélectine Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ GPIb/IX/V GPIV PECAM-1 $\alpha_v\beta_3$ Stomatin TLT-1 PDGF, VEGF, EGF Facteur V, Facteur VIII Fibronectine, PF4 Vitronectine, vWf Thrombospondine Fibrinogène Immunoglobulines (IgG, IgA, IgM)	GPIb Intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ P-sélectine CD107a (LAMP-1) CD107b (LAMP-2) CD63 (LAMP-3) Sérotonine, Histamine ATP, ADP, GTP, GDP Calcium, Magnésium	CD107a (LAMP-1) CD107b (LAMP-2) CD63 (LAMP-3) Carboxypeptidase Phosphatase acide Cathepsin D et E

La sécrétion des granules plaquettaires est contrôlée par les mécanismes de la signalisation intracellulaire. Les plaquettes peuvent être activées par plusieurs agents physiologiques, tels que la thrombine, l'ADP, le collagène, la TXA_2 et l'épinéphrine. Ces agents interagissent avec leurs récepteurs membranaires spécifiques et déclenchent la cascade de signalisation intracellulaire.⁴⁰³ Bien que la plupart de ces agonistes soient capables d'induire une sécrétion granulaire

importante, seule la thrombine apparaît avoir le pouvoir d'induire la sécrétion des lysosomes.⁴⁰⁴ Les mécanismes de signalisation de la sécrétion plaquettaire semblent être majoritairement dépendants de la voie de la PLC et des seconds messagers du DAG et de l'inositol triphosphate ("Triphosphate Inositol", IP₃). Suite à l'activation plaquettaire, la PLC génère l'IP₃ et le DAG, ce qui provoque une augmentation intracellulaire en calcium et permet l'activation des PKCs respectivement. Les plaquettes contiennent plusieurs isoformes de PKC (α , β_1 , β_{11} , δ , ζ , η , θ) et il semble que chacune de ces isoformes possède un rôle particulier dans l'activation et la sécrétion des plaquettes (le deuxième chapitre de ce mémoire sera exclusivement consacré à l'étude des PKCs).⁴⁰⁵ Les PKCs peuvent, par la suite, phosphoryler un ensemble de protéines intracellulaires impliquées dans le transport et la sécrétion des granules plaquettaires.⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁹

Les mécanismes moléculaires de la sécrétion plaquettaire furent longtemps ignorés et ce n'est qu'au cours des quelques dernières années qu'ils furent complètement élucidés. Les plaquettes contiennent une machinerie moléculaire pour la sécrétion d'une panoplie de protéines et enzymes impliquées dans l'exocytose des granules de sécrétion. Ces protéines comprennent principalement le facteur sensible au N-éthylmaleimide ("N-éthylmaleimide sensitive factor", NSF), la protéine soluble associée au NSF ("Soluble NSF-Associated Protein", SNAP), les récepteurs du SNAP ("SNAP Receptors", SNARE), ainsi que les protéines Sec1 et Rab.^{408, 410} Au repos, les protéines de la famille SNARE forment un complexe membranaire *cis* visant à inhiber l'exocytose des granules. Au cours de l'activation plaquettaire, les protéines SNAP et NSF sont activées et elles inhibent le complexe *cis*-SNARE, ce qui permet l'interaction de Sec1 à la syntaxine 4 (les syntaxines appartiennent à la famille des protéines SNARE); interaction qui semble être sous la dépendance des PKC. Par la suite, un complexe *trans*-SNARE se forme au niveau de la membrane, ce qui apparaît être essentiel au phénomène de l'exocytose. Finalement, suite à l'action des PKC et à l'élévation du calcium intracellulaire, les granules de sécrétion font fusion avec la membrane et entraînent l'exocytose.⁴¹¹⁻⁴¹³

2.3.4 Agrégation plaquettaire et stabilité de l'agrégat

L'adhésion, l'activation et la sécrétion mènent ultimement à l'agrégation plaquettaire, la dernière phase de l'hémostase primaire. L'étape déterminante de l'agrégation plaquettaire repose sur le changement de conformation structurale de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, permettant ainsi sa liaison au fibrinogène soluble et la formation d'un agrégat plaquettaire. Au repos, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

maintient une très faible activité de liaison pour ces ligands, tel le fibrinogène, ce qui permet aux plaquettes de circuler librement dans le sang. Suite à l'exposition des composantes de la matrice sous-endothéliale ou en présence d'agonistes plaquettaires solubles, comme la thrombine, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ s'active très rapidement et son affinité pour le fibrinogène augmente instantanément. Bien entendu, cette activation dépend exclusivement des voies de signalisation intracellulaire déclenchées par la stimulation des plaquettes via leurs récepteurs membranaires spécifiques. Ce phénomène cellulaire est qualifié de signalisation "intérieure-extérieure" (*inside-out*), comparativement à la signalisation "extérieure-intérieure" (*outside-in*), issue de la liaison du fibrinogène au récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁴¹⁴ La signalisation "*inside-out*" menant à l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ dépend de la nature de l'agoniste et ainsi du récepteur stimulé. Par exemple, la thrombine, via ses récepteurs spécifiques, les PARs, déclenche l'activation des protéines Gq, de la PLC β et des PKC, tandis que la stimulation plaquettaire au collagène active la famille des tyrosines kinases (Src et Syk), de la PLC γ et des PKCs (voir section 2.3.2 de ce chapitre).⁴¹⁵⁻⁴¹⁷ Malgré les différences observées dans les mécanismes de signalisation intracellulaire, chacune des voies déclenchées par les différents agonistes plaquettaires importants a la capacité d'induire le changement de conformation des deux sous-unités de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et, ainsi, de déclencher l'agrégation plaquettaire.

La stabilité de l'agrégat plaquettaire confère aux plaquettes une force adhésive leur permettant de résister aux pressions hémodynamiques de la circulation et demeure essentielle à l'irréversibilité de l'agrégat en cours. Cette étape provient principalement de la signalisation "*outside-in*", suite à la liaison du fibrinogène à l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.⁴¹⁸ En plus d'être essentielle à la formation d'un agrégat plaquettaire ferme et stable, cette signalisation favorise la dégranulation complète des plaquettes et leur confère une activité procoagulante.⁴¹⁹ Des études effectuées à l'aide de plaquettes humaines et des cellules CHO transfectées avec le récepteur $\alpha_{IIb}\beta_3$ ont révélé la présence d'au moins trois voies signalétiques "*outside-in*" distinctes (Figure 2.9).^{420, 421}

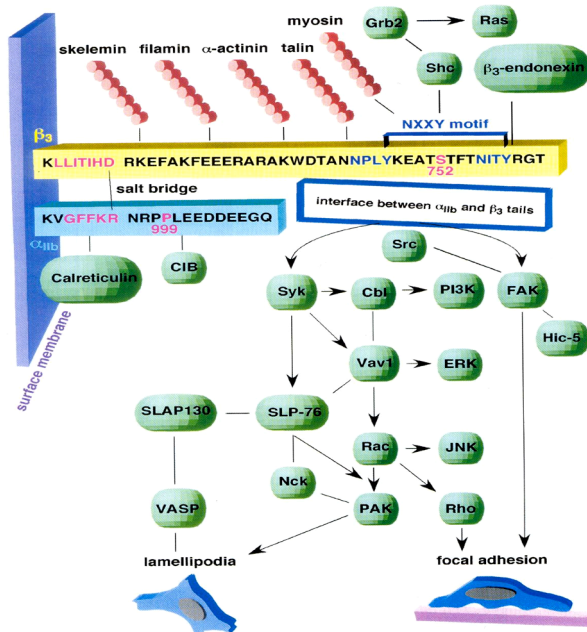


Figure 2.9 : Mécanismes de la signalisation plaquettaire "outside-in" de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Michelson A.D. (2002). *Platelets*. First Edition. Burlington : Academic Press. pp. 106.

La première voie résulte de l'activation de la tyrosine kinase Syk, la deuxième provient de l'activation de la pp125^{FAK} et la troisième débute par la phosphorylation des résidus tyrosine de la queue cytoplasmique de la chaîne β_3 . La voie caractérisée par l'activation de Syk et celle de la pp125^{FAK} sont toutes deux déclenchées suite à la formation de "clusters" des molécules d' $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{422, 423} Cependant, la voie de la pp125^{FAK} requiert, en plus, la stimulation plaquettaire à l'aide d'agonistes spécifiques, tels que la TxA₂ ou l'ADP.⁴²³ De plus, l'activation de Syk nécessite la queue cytoplasmique des deux sous-unités du récepteur, comparativement à la voie signalétique de l'activation de la pp125^{FAK} qui ne requiert que la sous-unité β_3 .⁴²²

L'activation de la voie cellulaire dépendante de la tyrosine kinase Syk provoque la phosphorylation séquentielle des protéines Cbl, Vav1, Rac et PAK. Cette signalisation est impliquée dans la formation de lamellipodes et dans l'étalement plaquettaire.^{424, 425} Cette cascade signalétique permet aussi l'activation de la SLP-76, une molécule adaptatrice multifonctionnelle activée par la tyrosine kinase Syk.⁴²⁶ La protéine SLP-76 interagit avec Nck, ce qui permet le recrutement de PAK, la protéine effectrice de Rac. Aussi, SLP-76 interagit avec la SLAP-130, une autre molécule adaptatrice pour, ensuite, lier la protéine VASP et favoriser la formation de lamellipodes plaquettaires.

La deuxième signalisation "*outside-in*" provient de l'activation de la protéine FAK (pp125^{FAK}). Cette voie est peu caractérisée, mais il semblerait que l'activation de FAK lui permettrait d'interagir avec la protéine Hic-5, une molécule adaptatrice impliquée dans le phénomène d'étalement plaquettaire.⁴²⁰

Finalement, la queue cytoplasmique de la sous-unité β_3 contient deux motifs NXXY servant de séquences qui interagissent avec certaines protéines contenant des domaines de liaison phospho-tyrosine. Les résidus Y747 et Y759, compris dans la séquence des motifs NXXY, se retrouvent phosphorylés suite à l'agrégation plaquettaire, ce qui génère des sites de liaison pour plusieurs molécules signalétiques, comme la Shc²³⁰. Les motifs NXXY de la sous-unité β_3 possèdent aussi un site de reconnaissance pour la myosine et cette interaction semble occuper une place importante dans la rétraction du caillot sanguin *in vitro*.⁴²⁷ L'importance physiologique de la signalisation "*outside-in*" de la sous-unité β_3 provient d'études chez des souris transgéniques où les résidus tyrosine 747 et 759 des motifs NXXY de la sous-unité β_3 furent substitués par des résidus phénylalanines. Les plaquettes de ces souris semblent être incapables de former des agrégats plaquettaires stables et démontrent un temps de saignement prolongé.⁴¹⁸

En plus de la signalisation "*outside-in*" de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, le CD40L semble aussi occuper un rôle important dans la stabilité de l'agrégat plaquettaire.²⁸ Effectivement, la formation du thrombus chez les souris CD40L déficientes est largement instable, telle que témoigné par la présence de plusieurs embolies plaquettaires, comparativement aux souris contrôles.

2.4 Rôle des plaquettes dans la pathologie

Même si la fonction la mieux définie des plaquettes est celle de l'hémostase et de la thrombose vasculaire, nous savons aujourd'hui que cette perception ne reflète pas toutes les diverses fonctions de ces cellules, puisqu'elles occupent une place fondamentale dans le développement et la progression de plusieurs pathologies. Tel que discuté plus haut, les plaquettes possèdent une machinerie moléculaire et cellulaire assez sophistiquée pouvant jouer un rôle dans plusieurs complications thrombo-inflammatoires, tel que l'athérosclérose et ses syndromes cliniques (maladie coronarienne et maladie vasculaire périphérique), le diabète, le cancer, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies auto-immunes, les maladies psychiatriques, et autres. Dans cette section nous discuterons de la contribution des plaquettes dans certaines de ces pathologies, soit l'athérosclérose, le cancer, et les AVCs.

2.4.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est aujourd'hui perçue comme une maladie inflammatoire chronique. La contribution des plaquettes dans la pathogénèse de cette complication fut ignorée pour fort longtemps. Grâce aux nouvelles technologies en microscopie intravitale et au développement de divers modèles athérosclérotiques chez la souris, il est maintenant clair que les plaquettes participent activement à toutes les facettes de l'athérosclérose, soit l'initiation, la progression et la stabilité de la plaque.

Maintes données expérimentales supportent l'importance des plaquettes dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Par exemple, dans un modèle athérosclérotique chez le lapin, il fut démontré que les plaquettes adhèrent avec prédilection aux sites athérosclérotiques avant même que les lésions soient détectables.⁴²⁸ Cette observation fut aussi confirmée chez la souris ApoE déficiente,⁴²⁹ ce qui suggère que les plaquettes sont parmi les premières cellules vasculaires (sinon les premières) présentes aux sites de lésions. Par ailleurs, l'adhésion des plaquettes à la paroi des vaisseaux coïncide avec l'expression de plusieurs gènes inflammatoires impliqués dans la pathogénèse de l'athérosclérose.⁴²⁹ L'inhibition spécifique du complexe GPIIb/IIIa plaquettaire, à l'aide d'anticorps ou suite à une délétion génétique, réduit significativement la taille des lésions et le recrutement des leucocytes aux sites en question.⁴³⁰ De plus, la présence de plaquettes activées circulantes et d'agrégats plaquettes/leucocytes favorise la formation des lésions athérosclérotiques.⁴³¹ Ce phénomène serait d'ailleurs dépendant de la P-sélectine plaquettaire, étant donné son importance dans la formation des complexes plaquettes/leucocytes et dans le recrutement des leucocytes aux sites thrombo-inflammatoires.

Ensemble, ces observations expérimentales démontrent clairement l'importance des plaquettes dans l'athérosclérose. Les mécanismes par lesquels les plaquettes contribuent à l'initiation et au développement des lésions athérosclérotiques sont résumés dans la figure 2.10.⁴³² L'adhésion des plaquettes à l'endothélium activé, au tout début de la lésion vasculaire, favorise l'initiation et le développement de la plaque de trois différentes façons. Premièrement, l'adhésion des plaquettes déclenche une réaction inflammatoire au niveau de l'endothélium, caractérisée par la relâche de cytokines (MCP-1 et RANTES), molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et $\alpha_v\beta_3$) et facteurs de croissance (PDGF, EGF et FGF) impliqués dans la formation de la plaque.⁴³³⁻⁴³⁶ Deuxièmement, suite à leur adhésion, les plaquettes sécrètent, à leur tour, plusieurs substances inflammatoires pro-athérogéniques (IL-1 β , CD40L, P-sélectine, PF4,

RANTES, etc) qui, avec les substances relâchées par l'endothélium, mettent en place des conditions propices essentielles à l'initiation de la plaque athérosclérotique.⁴³² Finalement, l'adhésion des plaquettes à l'endothélium favorise le recrutement, l'activation, la sécrétion et la transmigration des leucocytes aux sites athérosclérotiques.^{437, 438} Effectivement, il fut démontré que le recrutement des leucocytes aux sites athérosclérotiques est largement supérieur en présence de plaquettes adhérentes à l'endothélium qu'en absence de celles-ci.⁴³¹ Ceci s'explique par la grande densité en P-sélectine membranaire retrouvée à la surface des plaquettes activées (densité largement supérieure à celle de l'endothélium activé). De plus, ce recrutement est guidé par la relâche de plusieurs cytokines plaquettaires (MCP-1 et RANTES) favorisant le chimiotactisme des leucocytes aux sites en question.^{3, 439} Bien évidemment, suite à la rupture de la plaque, les plaquettes sont intimement impliquées dans la thrombose vasculaire suite à l'exposition des composantes de la matrice extracellulaire (voir section 2.3.3 pour les mécanismes de l'agrégation plaquettaire).

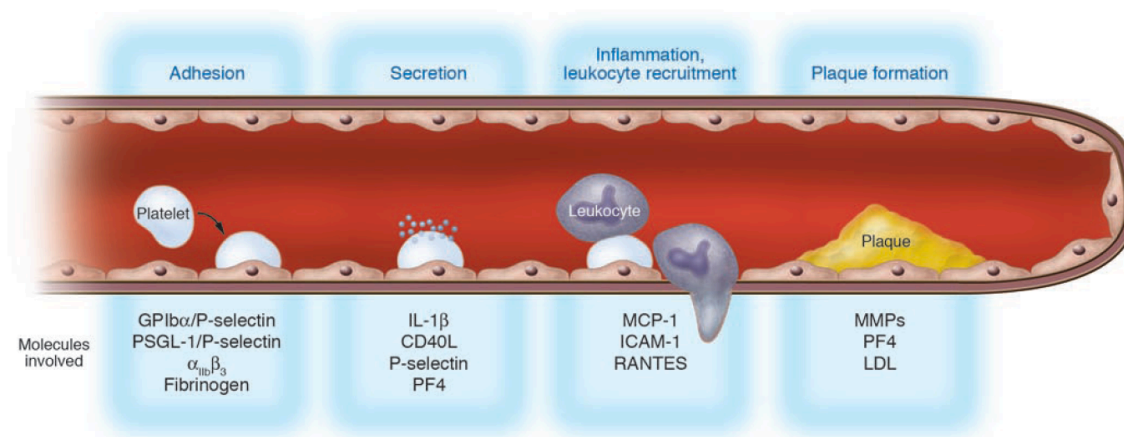


Figure 2.10 : Rôle des plaquettes dans la formation de la plaque athérosclérotique. Les plaquettes adhèrent au niveau de l'endothélium via les interactions GPIIb/IIIa-P-sélectine ou PSGL-1/P-sélectine. Par la suite les plaquettes adhèrent fermement à l'endothélium via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, sécrètent des substances pro-inflammatoires et déclenchent une réaction inflammatoire au niveau de l'endothélium. De plus les plaquettes adhérentes favorisent le recrutement et la transmigration des leucocytes aux sites de lésions. Gawaz M. et al. *J Clin Invest.* 2005; 115:3378-3384.

La progression de l'athérosclérose est intimement associée au développement des maladies coronariennes, tels que l'angine instable, l'infarctus du myocarde aigu et la maladie coronarienne stable.^{440, 441} De plus, les maladies vasculaires périphériques (artérielles et veineuses) sont aussi le résultat de complications liées à l'athérosclérose.⁴⁴² Pour cette raison les plaquettes occupent un rôle central dans le développement de ces complications cliniques et la grande majorité de ces

syndromes sont traités à l'aide d'agents anti-plaquettaires, tels que l'aspirine (inhibiteur de COX-1), les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (abciximab), les inhibiteurs de la thrombine (héparine) et les inhibiteurs des récepteurs à l'ADP (clopidogrel).

2.4.2 Le cancer

La première démonstration de la relation étroite qui existe entre les cellules tumorales et les plaquettes date des années soixante, au cours desquelles il fut démontré qu'une réduction du compte plaquettaire prévient le développement tumoral.⁴⁴³ Depuis ce temps, plusieurs agents thrombopéniques (qui cause la thrombopénie ou réduction du compte plaquettaire), inhibiteurs plaquettaires et anticoagulants ont été employés afin de traiter l'expansion tumorale. L'importance des plaquettes dans le cancer s'explique principalement par les interactions étroites entre celles-ci et les cellules tumorales ainsi que par leur implication dans les mécanismes de l'angiogénèse.^{444, 445}

Plusieurs observations convaincantes supportent la contribution des plaquettes dans le développement tumoral. Premièrement, les plaquettes interagissent avec certaines embolies tumorales et cette interaction prolonge la survie de ces tumeurs dans la circulation.⁴⁴⁶⁻⁴⁴⁸ Deuxièmement, l'interaction plaquette/tumeur induit une ischémie endothéliale exposant les composantes de la matrice sous-endothéliale aux tumeurs, ce qui facilite leur adhésion et leur arrêt.⁴⁴⁵ Troisièmement, la séquestration des tumeurs par les plaquettes prévient la réponse immunitaire anti-tumorale par les cellules T cytotoxiques et les cellules NK.^{449, 450} Quatrièmement, les plaquettes sécrètent plusieurs facteurs de croissances (VEGF et autres) favorisant l'angiogénèse tumorale.⁴⁵¹ Finalement, les plaquettes activées favorisent la génération de thrombine à leur surface, ce qui stimule la croissance tumorale et la formation de métastases.⁴⁴⁵

Chez les patients souffrants d'un cancer avancé, on dénote l'existence d'une boucle de rétroaction positive entre les plaquettes et les cellules tumorales. Les cellules tumorales sont en mesure d'activer les plaquettes, ce qui explique la forte présence de plaquettes activées en circulation chez ces patients. Les mécanismes par lesquels les cellules tumorales activent les plaquettes sont plus ou moins définis, mais il semble que la relâche de thrombine par les tumeurs et/ou le contact direct entre ces deux est en mesure d'expliquer ce phénomène.^{452, 453} Certaines cellules tumorales expriment l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et cette dernière serait impliquée dans leur

interaction avec les plaquettes (aussi via l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes activées, par l'entremise d'un pont formé par le fibrinogène, le vWF ou la fibronectine).^{454, 455} Une fois activées, les plaquettes sont à leur tour en mesure de favoriser l'activité des cellules tumorales, principalement via les observations discutées plus hauts (relâche de facteurs angiogéniques, évation au système immunitaire, ancrage à la matrice sous-endothéliale et génération de thrombine à la surface des plaquettes). Cette boucle de rétroaction positive est à la base des mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'influence des plaquettes sur les cellules tumorales.

La découverte de la contribution des plaquettes dans la physiopathologie du cancer soulève un potentiel intéressant face à la possibilité de gérer cette pathologie à l'aide d'agents anti-plaquettaires. Les inhibiteurs classiques de la fonction plaquettaire, tels que l'aspirine (inhibiteur de COX-1), les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ (abciximab), les inhibiteurs de la thrombine (héparine) et les inhibiteurs des récepteurs à l'ADP (clopidogrel) demeurent tous des cibles potentielles.⁴⁴⁵

2.4.3 Accident vasculaire cérébral (AVC)

L'AVC est la deuxième cause de mortalité dans le monde entier.^{456, 457} Environ 80% des AVCs sont dus à une ischémie cérébrale vasculaire, suite à une occlusion artérielle, tandis que seulement 20% des AVCs proviennent d'une hémorragie intracérébrale.^{458, 459} Étant donné que la grande majorité des AVCs sont secondaires à une occlusion artérielle, les plaquettes occupent un rôle central dans la physiopathologie de cette complication.

Plusieurs observations expérimentales et cliniques pointent vers l'importance des plaquettes dans la pathogénèse des AVCs. Premièrement, on dénote la présence de plaquettes activées et d'agrégats plaquettes/leucocytes au niveau de la zone ischémique des ganglions de la base dans un modèle d'ischémie/réperfusion chez le singe.⁴⁶⁰ Par ailleurs, on retrouve chez les patients ayant souffert d'un AVC une activation constitutive de plusieurs plaquettes en circulation.⁴⁶¹ Effectivement, les niveaux plasmatiques de plusieurs constituants plaquettaires, tels que la PF4, la β -TG et la thrombospondine, sont significativement plus élevés chez ces patients, comparativement aux patients contrôles.^{462, 463} De plus, on retrouve une forte accumulation et adhésion plaquettaire au niveau des artères qui irriguent le cerveau, telles que les carotides.^{464, 465} D'ailleurs, un tiers des thromboses vasculaires cérébrales proviennent d'une embolie d'un agrégat plaquettaire d'origine carotidienne.⁴⁶⁶ Bien évidemment, l'emploi d'agents

anti-plaquettaires, tels que l'aspirine, le clopidogrel et les inhibiteurs de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, démontrent des effets bénéfiques dans le traitement et la prévention des AVCs, ce qui supporte bel et bien la contribution des plaquettes dans cette complication.⁴⁶¹

Le développement de nouveaux modèles expérimentaux d'AVC chez l'animal et l'emploi de nouvelles méthodes en génétique permettant la manipulation de gènes spécifiques chez la souris (délétion, surexpression ou mutation) ont permis d'identifier avec précision les différentes molécules plaquettaires impliquées dans cette pathologie. En effet, il semble que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, le complexe GPIb/IX/V et la GPVI occupent un rôle bien précis dans le développement des AVCs.

L'inhibition de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, à l'aide d'anticorps spécifiques ou suite à une délétion génétique, prévient le développement d'AVCs expérimentaux chez la souris. Les animaux traités démontrent une faible accumulation en plaquettes et en fibrines, ce qui se traduit par une zone d'infarctus cérébrale significativement moins élevée, comparativement aux animaux contrôles.⁴⁶⁷
⁴⁶⁸ Par contre, la plupart de ces animaux se retrouvent avec des troubles de saignements importants qui, souvent, mènent à des complications hémorragiques cérébrales sévères. Il semble qu'une inhibition de 68% à 78% des récepteurs montre des effets bénéfiques sans toutefois induire des troubles de saignements significatifs.⁴⁶⁹

Le complexe GPIb/IX/V semble occuper un rôle crucial dans le développement des AVCs. Le blocage du site de liaison du vWF sur la molécule du GPIb α mène à une inhibition d'environ 60% de la taille de la zone d'infarctus cérébral chez la souris.⁴⁷⁰ De plus, l'injection des anticorps bloquant une heure suite à l'induction de l'AVC fut démontrée aussi efficace, témoignant ainsi de l'importance fondamentale de ce complexe dans cette complication. Malgré que les temps de saignements chez ces animaux apparaissent un peu plus long, aucun signe d'hémorragie cérébrale ne fut observé,⁴⁷⁰ ce qui indique que le complexe GPIb/IX/V pourrait constituer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des AVCs.

Comme pour le complexe GPIb/IX/V, la GPVI semble aussi participer au développement des AVCs, tel que démontré dans plusieurs modèles expérimentaux chez la souris.^{326, 471, 472} De plus, les animaux traités à l'aide d'anticorps anti-GPVI ne démontrent aucun signe de saignements cérébraux importants.⁴⁷⁰ Par contre, la déplétion de la GPVI apparaît moins efficace que celle de la GPIb α et, pour cette raison, le complexe GPIb/IX/V demeure la cible thérapeutique potentielle de choix dans le traitement des AVCs.

Chapitre 3

Rôle de l'axe CD40/CD40L dans la fonction plaquettaire

3.1 L'axe CD40/CD40L plaquettaire

Tel que discuté dans le premier chapitre, le CD40L, ainsi que le CD40, sont présents au niveau des plaquettes. Les plaquettes furent parmi les dernières cellules vasculaires auxquelles la présence de cet axe fut caractérisée. Depuis ce temps, nous savons que le complexe CD40/CD40L plaquettaire occupe une place importante dans certaines complications thrombo-inflammatoires. Par exemple, la grande majorité du sCD40L en circulation, auquel il existe une corrélation positive entre ses niveaux et l'incidence de plusieurs syndromes cardiovasculaires, est d'origine plaquettaire. Dans ce chapitre nous discuterons des quelques informations qui existent quant à la structure, aux mécanismes d'activation et au rôle de l'axe CD40/CD40L dans la fonction des plaquettes.

3.1.1 Structure et activation du CD40L plaquettaire

Les plaquettes à l'état de repos sont dépourvues du CD40L à la surface membranaire. Par contre, suite à leur activation, tel qu'en présence de thrombine, d'ADP ou de collagène, le CD40L est rapidement redistribué du cytosol à la membrane.³ L'activation du CD40L semble coïncider avec la sécrétion de plusieurs constituants des granules alpha (PF4, PDGF, TGF β et TSP), ce qui suggère que la molécule est constitutivement localisée au niveau de ces granules dans les plaquettes quiescentes.²⁰ Pour cette raison, les mécanismes moléculaires d'activation du CD40L sont les mêmes que pour ceux de la relâche des granules alpha (voir section 2.3.3 du deuxième chapitre). La structure du CD40L plaquettaire, comme pour celle des autres cellules vasculaires et autres, demeure sous forme d'un trimère composé de trois molécules associées par des liens non covalents.²⁰

Suite à l'activation cellulaire, plus précisément de quelques minutes à une heure, le CD40L est clivé de la membrane plasmique, libérant ainsi un fragment extracellulaire trimérique de 18- KDa. Le sCD40L garde sa fonctionnalité, étant donné qu'elle demeure en mesure de lier le CD40.⁴⁷³ D'ailleurs, 95% du sCD40L plasmatique est d'origine plaquettaire; le 5% restant semble provenir des lymphocytes T activés.⁵ Les mécanismes exacts du clivage du CD40L plaquettaire sont encore inconnus, mais il semble que la MMP-2 plaquettaire serait directement responsable de ce phénomène.^{474, 475} L'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ serait aussi impliquée dans son clivage, puisque les antagonistes spécifiques de cette intégrine (abciximab) préviennent la relâche du sCD40L en circulation (Figure 3.1).^{20, 474} Il est intéressant de noter que l'activité enzymatique de

la MMP-2 plaquettaire dépend de l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$,⁴⁷⁶ ce qui explique possiblement la coopération entre ces deux molécules dans les mécanismes de clivage du CD40L. De plus, la liaison du CD40 d'une plaquette avec le CD40L d'une autre, est nécessaire au clivage du CD40L membranaire, puisque le blocage de cette interaction prévient la relâche de la molécule dans le milieu extracellulaire.⁴⁷⁷

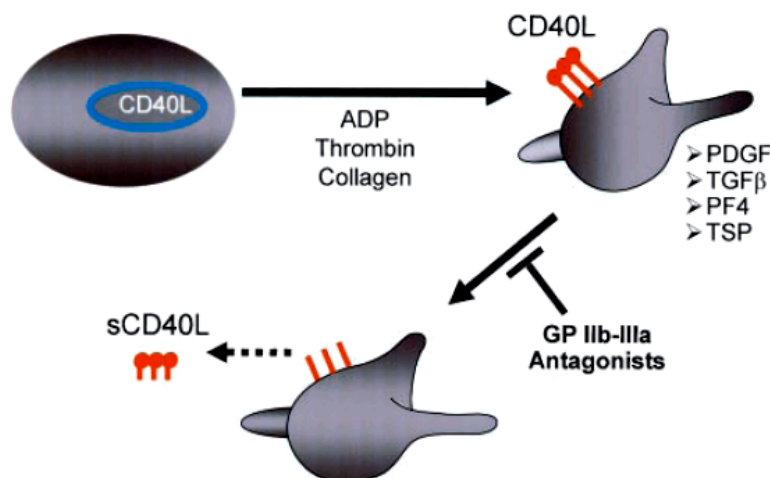


Figure 3.1 : Activation et clivage enzymatique du CD40L suite à l'activation plaquettaire. André P. et al. *Circulation*. 2002; 106:896-899.

3.1.2 Structure et activation du CD40 plaquettaire

Contrairement au CD40L, le CD40 est constitutivement présent au niveau des plaquettes, c'est-à-dire qu'il est retrouvé à la surface membranaire des plaquettes au repos. Certains investigateurs ont rapporté une faible augmentation du CD40 membranaire suite à l'activation des plaquettes. Cette augmentation demeure toutefois modeste, surtout en comparaison avec le CD40L.⁵

Tel que mentionné dans le premier chapitre, la structure du CD40 membranaire, plaquettaire ou autre, demeure ambiguë. Par contre, il semble y avoir un consensus au niveau de la littérature supportant la présence d'un trimère pré-assemblé au niveau de la membrane, comparativement à l'hypothèse voulant que la liaison du CD40L déclenche la formation du trimère. Ce consensus provient en partie d'une élégante étude démontrant que les récepteurs de la famille du TNF, incluant le CD40, se retrouve déjà sous forme d'un trimère pré-assemblé au niveau de la membrane plasmique.²⁵

3.2 Rôle de l'axe CD40/CD40L plaquettaire

La fonction du complexe CD40/CD40L plaquettaire commence tout juste à être exploré, de sorte qu'il n'existe que seulement quelques informations à cet égard. Ensemble, les études ayant traité de ce sujet ont démontré que le CD40L plaquettaire est en mesure d'induire une réaction inflammatoire importante au niveau des cellules endothéliales,³ que le CD40L des plaquettes est impliqué dans la stabilisation des agrégats plaquettaires,²⁸ de par son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et que la liaison du CD40 plaquettaire favorise l'activation des plaquettes et la relâche de la cytokine inflammatoire RANTES ainsi que la génération de ROS.^{63, 64, 473}

3.2.1 Rôle du CD40L plaquettaire dans l'activation de l'endothélium

La première étude ayant attribué un rôle bien spécifique au complexe CD40/CD40L plaquettaire provient du groupe de Heen et al.³ En plus d'être les premiers à avoir démontré la présence de ce complexe au niveau des plaquettes, ils soulignèrent aussi l'importance du CD40L des plaquettes dans l'activation des cellules endothéliales. Effectivement, la liaison du CD40 au niveau de l'endothélium par le CD40L des plaquettes activées, engendre l'augmentation des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et E-sélectine, la relâche des cytokines MCP-1, IL-6, et IL-8, la production de certaines MMPs, telle que la MMP-9, et l'expression du facteur tissulaire membranaire (Figure 3.2).³ Ces réponses cellulaires seraient d'ailleurs impliquées dans la fonction inflammatoire du CD40L lors de l'athérosclérose. Tel que discuté dans la section 2.4.1, les plaquettes sont parmi les premières cellules vasculaires aux sites athérosclérotiques et leur interaction avec l'endothélium activé représente une étape essentielle au développement de la plaque. L'interaction du CD40L des plaquettes avec le CD40 des cellules endothéliales serait en principe une étape fondamentale de l'athérosclérose et des réactions inflammatoires.

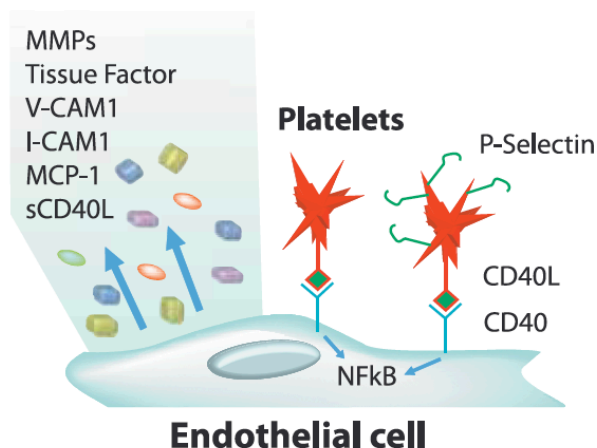


Figure 3.2 : Rôle du CD40L plaquettaire dans l'activation des cellules endothéliales. Lievens D. et al. *Thromb Haemost.* 2009; 102:206-214.

3.2.2 Rôle du CD40L plaquettaire dans la stabilisation du thrombus

La molécule du CD40L possède un domaine KGD, permettant ainsi son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ qui possède un domaine de reconnaissance à la séquence KGD.^{28, 29} Les souris déficientes en CD40L possèdent un défaut de thrombose, tel que démontré par une instabilité importante des agrégats plaquettaires dans un modèle d'hémostase *in vivo*.²⁸ Ce défaut de thrombose est renversé lorsque les souris en question sont infusées par le sCD40L, ce qui suggère que le CD40L, soit membranaire et/ou soluble, est impliqué dans la formation d'agrégats stables et irréversibles. De plus, ce mécanisme physiologique serait dépendant de l'interaction du CD40L avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et non avec le CD40, puisque l'injection d'une forme soluble du CD40L mutante, ayant perdu sa capacité de liaison avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, n'est pas en mesure de corriger les défauts hémostatiques présents chez les souris CD40L déficientes, comparativement à la forme soluble sauvage.²⁸ Par ailleurs, cette étude démontre aussi que les souris CD40 déficientes ne possèdent aucun défaut hémostatique, ce qui confirme que le CD40L favorise la stabilité des agrégats plaquettaires via son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ et non le CD40. Les mécanismes signalétiques par lesquels cette interaction stabilise la thrombose sont encore inconnus, mais il fut démontré par la suite, par ce même groupe, que la liaison du sCD40L aux plaquettes activées engendre la phosphorylation de la queue cytoplasmique de la chaîne β_3 de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²⁹

3.2.3 Rôle du CD40 plaquettaire dans l'activation et la sécrétion des plaquettes

Tel que discuté plus haut dans ce chapitre, les plaquettes au repos expriment aussi le récepteur de haute affinité du CD40L, le CD40. En 2003, il fut démontré pour la première fois que la stimulation des plaquettes au repos à l'aide du CD40L engendre certains éléments de l'activation plaquettaire, tels que l'activation de la P-sélectine et la formation de complexe plaquettes/neutrophiles, ainsi que le changement de forme plaquettaire.⁴⁷³ La formation des complexes plaquettes/neutrophiles serait indirectement liée à l'activation de la P-sélectine par le CD40L, et non au CD40L lui-même, malgré qu'il fut aussi démontré que le CD40L des plaquettes activées est en mesure d'interagir avec le CD40 des neutrophiles.⁸¹ Ces réponses cellulaires seraient totalement dépendantes de l'interaction du CD40L avec le CD40 des plaquettes et non avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Suite à cette étude, il fut aussi démontré que le sCD40L induit la sécrétion de la cytokine inflammatoire RANTES et la génération de ROS, suite à la liaison du CD40 des plaquettes quiescentes.^{63, 64} Ces études soulignent aussi l'implication de la p38 MAPK dans la signalisation induite par l'activation du complexe CD40/CD40L. En effet, le blocage de cette kinase semble prévenir les effets activateurs du sCD40L sur la fonction plaquettaire. Par contre, la contribution des TRAFs dans ces voies cellulaires ne fut aucunement évaluée.

Hypothèse et objectifs

Le complexe CD40/CD40L occupe une place fondamentale dans une variété de réactions inflammatoires, de par son expression ubiquitaire au niveau des cellules du système vasculaire. Le blocage de cet axe prévient ou améliore significativement les complications associées à plusieurs pathologies importantes, telles que l'athérosclérose, le cancer, le diabète de type I, la sclérose en plaques et l'arthrite rhumatoïde dans des modèles expérimentaux. D'ailleurs, le sCD40L est aujourd'hui reconnu comme une molécule thrombo-inflammatoire prédictive des événements cardiovasculaires, de sorte qu'il existe une corrélation étroite entre ses niveaux circulants et l'incidence des ACS. Les plaquettes sont la principale source du sCD40L plasmatique, malgré que son impact exact sur la fonction plaquettaire et les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents demeurent inconnus.

Hypothèse : Les plaquettes jouent un rôle central dans le développement des maladies cardiovasculaire et étant donné la corrélation étroite qui existe entre les niveaux circulants du sCD40L et l'incidence des ACS, le sCD40L plasmatique pourrait être en mesure d'activer prématurément les plaquettes quiescentes en circulation et ainsi contribuer aux complications associées à ces syndromes cliniques.

Objectifs : Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de :

- 1- Évaluer l'impact du sCD40L sur l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*,
- 2- Déterminer le récepteur cible (CD40, etc.) sur lequel le sCD40L agit au niveau plaquettaire,
- 3- Décortiquer les voies signalétiques moléculaires plaquettaires induites par le sCD40L,
- 4- Analyser l'effet *in vivo* du sCD40L sur la formation du thrombus dans un modèle murin.

Résultats attendus : Ce projet a été conçu sous les prémisses que :

- 1- Le sCD40L est en mesure d'activer les plaquettes au repos et d'augmenter significativement la fonction plaquettaire.
- 2- Les effets du sCD40L sur la fonction plaquettaire sont dépendants du CD40 et de son association avec les TRAFs.
- 3- L'augmentation des niveaux plasmatiques du sCD40L chez la souris exacerbe la formation du thrombus en réponse à un dommage vasculaire.

Chapitre 4

Contribution Scientifique

Mise en contexte pour le premier article :

Le CD40L active les plaquettes et augmente l'agrégation plaquettaire par l'entremise d'une voie signalétique TRAF-2/Rac1/p38 MAPK CD40-dépendante

L'axe CD40/CD40L est un complexe protéique essentiel à la production d'immunoglobulines lors de la réponse immunitaire. Cet axe participe aussi à plusieurs réactions inflammatoires importantes, étant donné sa vaste distribution au niveau des cellules du système vasculaire. La forme soluble du CD40L retrouvée en circulation, le sCD40L, est aujourd'hui considérée comme un marqueur clinique important qui pourra sans doute être employé dans le future comme outil diagnostique et préventif dans le traitement des maladies vasculaires.

Étant donné que la grande majorité du sCD40L plasmatique provient des plaquettes, certains investigateurs ont évalué son impact sur la fonction plaquettaire. Par contre, ses effets sur les diverses fonctions des plaquettes, telle que l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus *in vivo*, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents demeurent mal caractérisés, d'où l'objectif de cette étude.

Contribution des auteurs :

Daniel Yacoub : Planification et exécution des expériences d'agrégation et d'activation plaquettaire (Figure 1 et 6), de microscopie électronique et confocale (Figure 3) et de signalisation intracellulaire et moléculaire (Figure 4 et 5). Rédaction et correction de l'article.

Ahmed Hachem : Planification et exécution des expériences d'association des TRAFs au CD40 (Figure 2) et de signalisation intracellulaire et moléculaire (Figure 4 et 5), ainsi que correction de l'article.

Jean-François Théorêt : Planification des expériences de microscopie électronique et correction de l'article.

Walid Mourad : Codirection générale.

Yahye Merhi : Direction générale.

CD40L Primes Platelets and Enhances Agonist-Induced Platelet Activation and Aggregation through a CD40-Dependant TRAF-2/Rac1/p38 MAPK Signaling Pathway

Daniel Yacoub, MSc; Ahmed Hachem, MSc; Jean-François Théorêt, PhD; Walid Mourad, PhD; Yahye Merhi, PhD

Short title: Soluble CD40L and platelet function

Subject Codes: [92] Platelets,
[178] Aggregation
[188] Thrombosis risk factors
[181] Signal Transduction

Word count: 5731

From the Research Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Faculty of Medicine (D.Y., A.H., J-F.T., M-A.G., Y.M.) and CR-CHUM, Université de Montréal (W.M.), Montreal, Quebec, Canada.

D.Y. and A.H. contributed equally to this work

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355.

Abstract

Background-CD40L is a thrombo-inflammatory molecule that predicts cardiovascular events. Platelets constitute the major source of soluble CD40L (sCD40L) found in plasma, albeit its exact functional impact on platelet function and the underlying molecular mechanisms remain undefined.

Methods and Results-sCD40L strongly enhances activation and aggregation of washed human platelets induced by sub-threshold concentrations of agonists. Human platelets treated with a mutated form of sCD40L that does not bind CD40 and CD40^{-/-} mouse platelets failed to elicit such responses. Furthermore, we found that platelets express multiple members of the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor (TRAF) family, among which only TRAF-2 associates with CD40 upon sCD40L stimulation. Noticeably, sCD40L primes resting platelets through activation of the small GTPase Rac1 and its downstream target p38 mitogen activating protein kinase (MAPK), which leads to platelet shape change and actin polymerization. Moreover, CD40^{-/-} mice show impaired platelet aggregation and shape change in response to collagen, thus highlighting the importance of CD40 signaling in platelet-platelet interactions.

Conclusions- These data establish sCD40L as an important platelet primer predisposing platelets to enhanced activation and aggregation in response to stimulus. This may explain in part the link between levels of circulating sCD40L and the occurrence of cardiovascular diseases.

Key Words: platelets ■ signal transduction ■ inflammation ■ CD40L

Introduction

Multiple lines of evidence now support a plethora of inflammatory mediators potentially involved in the pathogenesis of vascular disease. Among these, the CD40 ligand (CD40L)/CD40 dyad has been the focus of much attention and circulating levels of soluble CD40L (sCD40L) are now considered as reliable predictors of cardiovascular events.¹⁻⁴

CD40L is a 48-kDa trimeric transmembrane protein belonging to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily originally identified on cells of the immune system.^{5, 6} Interaction of CD40L with its respective receptor on B cells, CD40, a 39-kDa glycoprotein from the TNF receptor family, is of critical importance for immunoglobulin isotype switching during the immune response.⁷ Today, we know that these two molecules are also present on cells of the vascular system, including endothelial cells, monocytes/macrophages, smooth muscle cells and platelets,^{8, 9} and have important implications in inflammatory reactions, through up-regulation of cell adhesion molecules and production of pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, matrix metalloproteinases and procoagulants.^{8, 10-12} The involvement of the CD40L/CD40 dyad in thrombo-inflammation has been highlighted in all pathogenic phases of atherosclerosis, including endothelial dysfunction, platelet activation, thrombosis, and neointima formation.¹³⁻²⁰

Platelets are highly specialized blood cells of paramount importance in normal hemostasis and thrombo-inflammatory complications. The pioneering work of Heen and collaborators showed that both CD40L and its receptor CD40 are found in platelets.⁸ While CD40 is constitutively expressed on platelets, CD40L rapidly appears on the platelet surface following activation, upon which it is subsequently cleaved generating a soluble fragment of 18-kDa, termed sCD40L, accounting for >95% of its plasmatic concentration.²¹ Circulating levels of sCD40L in patients have now emerged as strong indicators of cardiovascular risk, as there appears to be a significant correlation between levels of sCD40L and vascular complications such as atherosclerosis and acute coronary syndromes.²⁻⁴

Although the presence of the CD40L/CD40 dyad in platelets is well defined, its exact involvement in platelet function remains elusive. Andre and al. have shown that CD40L binds to $\alpha_{IIb}\beta_3$ and stabilizes arterial thrombi in mice,¹³ while others have shown that CD40L can induce platelet activation and secretion of reactive oxygen species and the chemokine RANTES through binding of CD40.^{14, 17, 22} Nevertheless, the physiological impact and the mechanisms involved in CD40L-induced platelet activation are still undefined. Here we show that sCD40L primes and

enhances agonist-induced activation and aggregation of human platelets through a CD40-mediated TNF Receptor Associated Factor (TRAF)-2/Rac1/p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) dependant pathway, which ultimately leads to platelet shape change and actin polymerization. Moreover, we found that CD40^{-/-} mice exhibit impaired platelet aggregation and shape change in response to collagen, thus highlighting the importance of CD40 signaling in platelet-platelet interactions.

Methods

This study has been approved by the human and animal ethical committees of the Montreal Heart Institute. All human subjects gave informed consent and were free from drugs interfering with platelet function.

Reagents and antibodies

Recombinant human soluble CD40L (sCD40L) was obtained from R&D systems (Minneapolis, MN), while recombinant mouse soluble CD40L (msCD40L) came from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Recombinant human mutant sCD40L^{R/Y} (Arginin (R) 203 for Alanin and Tyrosin (Y) 145 for Alanin) and its wild type counterpart sCD40L^{WT} were generated as previously described.²³ Antibodies against TRAF-1, -2, -3, and -6 were all purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Anti-CD40 antibody used for immunoprecipitation of human CD40 was also from R&D systems, while anti-CD40 antibody used for detection of CD40 by immunoblotting came from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phospho-VASP (Ser¹⁵⁷), anti-phospho-p38 (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸²), anti-VASP (total) and anti-p38 (total), as well as the antibody against Rac1 were all procured from Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Antibodies against P-selectin (AK4) and the active form of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (PAC-1) were obtained from BD Biosciences (Mississauga, ON). The specific Rac1 NSC23766 inhibitor, the p38 SB203580 inhibitor and the actin polymerization Latrunculin B inhibitor were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Alexa Fluor 555-phalloidin came from Invitrogen (Carisbad, CA). Protein A agarose beads were obtained from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY) and p21-activated kinase-protein binding domain (PAK1-PBD) beads were from Cytoskeleton, Inc (Denver, CO). Native type I collagen and adenosine diphosphate (ADP) were from Chronolog

Corp. (Havertown, PA), while human thrombin was purchased from Sigma-Aldrich (Oaskville, ON).

Animals

Age- and sex-matched wild type (WT) and CD40^{-/-} mice, both on C57BLK/J6 background, were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed under pathogen free conditions. Handling and care of animals were in compliance with guidelines established by the animal care and ethical committee of the Montreal Heart Institute.

Isolation of human and mouse platelets

Venous blood was drawn from healthy volunteers, free from medication known to interfere with platelet function for at least 10 days before the experiment, in accordance with the guidelines of the human ethical committee of the Montreal Heart Institute. Platelet-rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation of acid citrate dextrose (ratio of 1:5) anticoagulated blood at 200g for 15 minutes. Platelets were then pelleted from PRP, to which 1 µg/mL of PGE₁ was added, washed with HBSS-Hank's sodium citrate buffer (138 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.2 mM Na₂HCO₃, 5.6 mM Glucose, 10 mM HEPES, 12.9 mM sodium citrate, pH 7.4), also containing PGE₁ (0.5 µg/mL), and finally resuspended in HBSS-Hank's buffer containing 2 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂.

Murine washed platelets were prepared from mice anesthetized with a mixture of 75 mg/kg of Ketamine (Vetalar, Belleville, QC) and 0.5 mg/kg of medetomidine (Domitor, Pfizer, Kirkland, QC). Blood was drawn by cardiac puncture in 1-cc syringes containing 50 µL of heparin (1000 iU/mL) and diluted (1:1) with modified Tyrode's buffer (150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mg/mL BSA, 1 mg/mL dextrose, pH 7.4), containing prostacyclin (0.2 µg/mL). PRP was obtained by centrifugation of blood at 164g for 8 minutes, to which prostacyclin (0.1 µg/mL) was added, and platelets were pelleted by centrifugation at 1000g for 5 minutes. Platelets were finally resuspended in modified Tyrode's buffer.

Human and mouse platelets were adjusted to 250 x 10⁶ platelets/mL, unless otherwise specified, and allowed to rest at 37°C for 30 minutes before further manipulation.

Flow cytometry analysis of platelet activation

Translocation of platelet P-selectin and activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ were measured by flow cytometry, as previously described.²⁴ Platelets were preincubated with sCD40L prior to cell stimulation with agonists, fixed with 1% paraformaldehyde, washed and stained with saturating concentrations of anti-P-selectin antibody (AK4-PE conjugated) for 30 minutes or its isotype-matched control IgG. For measurement of $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, PAC-1 antibody (FITC-conjugated) was incubated with platelet suspensions prior to activation with sCD40L and agonists. Platelets were analyzed (20,000 events) on an Altra flow cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON) and gated by their characteristic forward and side scatter properties.

Measurement of platelet aggregation

Aggregation of human and mouse washed platelets was monitored on a four-channel optical aggregometer (Chronolog Corp., Havertown, PA) under shear (1000 rpm) at 37°C. sCD40L (human, mouse and the mutated R/Y and WT forms) was preincubated with platelet suspensions under static conditions at 37°C, 30 minutes prior to addition of agonists, and traces were recorded until stabilization of platelet aggregation was reached.

Immunoprecipitation of CD40

Platelets (500×10^6 /mL) were stimulated as indicated, pelleted, then lysed into ice-cold RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.25% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium-orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, and 2 μ g/mL benzamidin) for 1 hour at 4°C. Lysates were sonicated on ice and pre-cleared with 100 μ L of protein A agarose beads for 15 minutes at 4°C. Beads were then pelleted and the supernatant was incubated with 5 μ g/mL of anti-CD40 antibody overnight at 4°C. Samples were treated with 100 μ L of protein A agarose beads for 1 hour at 4°C and precipitated by centrifugation, washed three times with ice-cold RIPA lysis buffer, resuspended in 2X Laemmli buffer, and boiled for 5 minutes. Supernatants were analyzed by immunoblot for the presence of TRAF-1, -2, -3, and -6, as well as CD40.

SDS-PAGE and immunoblotting

Proteins were resolved in 8% or 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk for 1 hour, washed three times with TBS/T (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, 0.1 % Tween-20) and incubated with appropriate primary antibody overnight at 4°C. Following washing steps, membranes were labeled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour, washed and bound peroxidase activity was detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA). Membranes for phospho-VASP and phospho-p38 MAPK were stripped and re-blotted for respective total protein detection.

Rac1 activation assay

Platelets (1×10^9 /mL) were treated with sCD40L and reactions were terminated by addition of an equi-volume of ice-cold 2X lysis buffer (50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 2% Igepal, 20% glycerol, 20 mM MgCl₂, 50 mM sodium fluoride, 2 mM EDTA, 2 mM sodium orthovanadate, 20 µg/mL leupeptin, and 20 µg/mL aprotinin). Lysates were then clarified by centrifugation at 14,000g for 5 minutes at 4°C and supernatants were treated with 10 µg of PAK1-PBD beads for 1 hour at 4°C. Beads were centrifuged and washed three times with ice-cold lysis buffer. They were then resuspended in 2X Laemmli sample buffer, boiled for 5 minutes, and supernatants were analyzed by immunoblotting for the presence of Rac1.

GDP and GTPγS were used as negative and positive controls, respectively. Supernatants from lysates were treated with either GDP (1 mM) or GTPγS (100 µM) for 15 minutes at room temperature, and reactions were terminated by placing samples on ice and adding MgCl₂ (60 mM). Samples were then clarified by centrifugation, incubated with PAK1-PBD beads, and treated with the same procedure as described above.

Scanning electron microscopy

Platelets treated or not with sCD40L were allowed to immobilize on 2% bovine serum albumin (BSA)-treated glass coverslips for 30 minutes at 37°C. Samples were then fixed in 2% paraformaldehyde overnight at 4°C. Dehydration of surfaces was achieved by placing samples in ethanol/water followed by amyl acetate/ethanol baths for 15 minutes each, increasing the ethanol/water proportion from 30% to 100% and the amyl acetate/ethanol proportion from 25%

to 100%. Slides were subsequently coated with gold palladium particles and analyzed on a Hitachi S-4700 Field Emission Gun Scanning Electron Microscope (FEG-SEM).

Actin polymerization assay

Platelets treated or not with sCD40L in the presence or absence of Latrunculin B were allowed to immobilize on 2% BSA-treated glass coverslips for 30 minutes at 37°C. Samples were then fixed in 2% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature. Platelets were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in 2% BSA and stained with Alexa555-phalloidin in 1% BSA for F-actin detection. Series of fluorescent confocal images (Z stacks) were acquired with a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). Alexa555-phalloidin was visualized using a 543-nm helium-neon laser line and a 63x/1.4 plan-apochromat objective (Zeiss) was used for magnification (voxel size is 28 nm X 28 nm X 250 nm (X,Y,Z)). Final images were produced using the Zeiss LSM 510 software and saved as LSM files.

Measurement of intracellular calcium flux

Platelets in HBSS-Hank's sodium citrate buffer were incubated with 5 µg/ml Fluo-4 AM for 30 minutes at 37°C. Platelets were then removed from excess Fluo-4 AM by centrifugation and resuspended in final HBSS-Hank's buffer containing 2 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂. Platelets were then placed onto a FluoroDish and mounted on a LSM 510 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). sCD40L (1 µg/ml) or thrombin (0.1 U/ml) was added to the platelet suspension and series of fluorescent confocal images were acquired in real-time at a rate of 30 images/second (excitation wavelength selected was 488 nm).

Dense granule release

ATP release was measured by a Lumi-Aggregometer according to the manufacturer's instructions (Chrono-log Corp. Havertown, PA). Briefly, 25 µl Luciferin-Luciferase (Chrono-Lume) reagent was added to a 475 µl platelet suspension 2 minutes before addition of sCD40L (1 µg/ml) or thrombin (0.1 U/ml).

Dense granule release was measured by mepacrine uptake into platelets.²⁵ Platelets in HBSS-Hank's sodium citrate buffer were incubated with 5 µM mepacrine (Quinacrine dihydrochloride, Sigma-Aldrich) for 30 minutes at 37°C. Platelets were then removed from excess mepacrine by

centrifugation and resuspended in final HBSS-Hank's buffer containing 2 mM MgCl₂ and 2 mM CaCl₂. Secretion of dense body constituents was evaluated by flow cytometry as the fluorescence remaining in platelets upon stimulation with sCD40L or thrombin; in comparison to resting platelets (excitation wavelength selected was 488 nm).

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by a Dunnetts-*t*-test for comparison against a single group. Data with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

sCD40L Enhances Platelet Activation and Aggregation through Interaction with CD40

We first evaluated the functional effects of sCD40L on platelet activation and aggregation, as it remains poorly characterized. Incubation of platelets with sCD40L alone had no effect on platelet aggregation (Figure 1A, upper panel), but led to a significant and dose-dependent increase of platelet aggregation induced by a sub-threshold or priming concentration of collagen, thrombin or ADP (Figure 1A), indicating that this is a broad platelet phenomena and not agonist-specific. As sCD40L showed a significant impact on platelet aggregation, we sought to determine its effect on platelet activation. As expected, sCD40L was unable to trigger activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$ on resting platelets, while it caused a significant increase in P-selectin expression (Figure 1B). However, $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and P-selectin expression were both significantly enhanced in the presence of sub-threshold concentration of collagen, thrombin and ADP.

Since it has been shown that $\alpha_{IIb}\beta_3$, in addition to CD40, can constitute a CD40L receptor on the platelet surface,^{13,26} it was imperative to investigate through which receptor sCD40L acts. In order to address this issue, we first generated a mutant recombinant sCD40L (sCD40L^{R/Y}), that does not bind CD40 while retaining $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding (Supplemental Figure 1), and show that this molecule failed to enhance platelet aggregation induced by a priming concentration of collagen, as compared to its WT counterpart (sCD40L^{WT}) (Figure 1C). Second, contrary to platelets from WT mice, platelets from CD40^{-/-} mice were insensitive to mouse sCD40L in response to a sub-

threshold concentration of collagen (Figure 1D). These data clearly show that sCD40L enhances platelet function through interaction with its counter-receptor CD40.

sCD40L Triggers TRAF-2 Association with CD40

It is well established that the TRAF family is tightly linked to CD40 signaling in immune cells. The TRAF family comprises six known members, among which TRAF-1, -2, -3 and -6 have been the most studied, although their expression in platelets is yet to be determined. We therefore investigated the expression of the major TRAF members and their association with CD40 upon sCD40L stimulation. Interestingly, we found that in addition to CD40, platelets express TRAF-1, -2, and -6, while traces of TRAF-3 were detected (Figure 2A). Most importantly, only TRAF-2 associates with CD40 upon stimulation of resting platelets with sCD40L, while none of these members were shown to be associated with CD40 at baseline conditions (Figure 2A and 2B). In addition, sCD40L^{WT}, but not sCD40L^{R/Y}, caused association of TRAF-2, further supporting the contribution of CD40 in response to sCD40L.

sCD40L Induces Platelet Shape Change and Actin Polymerization

In search of the underlying cellular and molecular events involved in the effects of sCD40L on platelet function, we first found that stimulation of resting platelets with sCD40L caused a significant morphological shape change characterized by an increase in lamellipodia and filopodia formation (Figure 3A). Second, sCD40L induced actin polymerization, as noted by the increase in F-actin staining in treated platelets (Figure 3B). To determine the implication of these cytoskeletal and morphological changes in sCD40L-induced potentiation of platelet aggregation, we pretreated platelets with latrunculin B, a specific inhibitor of actin polymerization, and found that it completely reversed sCD40L's capacity to increase platelet aggregation (Figure 3C and 3D).

The Small GTPase Rac1 and p38 MAPK are Required for sCD40L Signaling

The Rho family GTPase member Rac1 and the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) represent key signaling components required for cytoskeletal reorganization and shape change in platelets. Phosphorylation of VASP, particularly at Ser¹⁵⁷, regulates its anticapping activity and thereby promotes platelet filopodia formation.²⁷ As shown in Figure 4A, stimulation of resting

platelets with sCD40L, but not with sCD40L^{R/Y}, induced phosphorylation of VASP on Ser¹⁵⁷ and activation of Rac1. In order to assess the implication of the small GTPase Rac1, we employed a specific Rac1 inhibitor, NSC23766. Pretreatment of platelets with NSC23766 significantly reversed sCD40L's ability to enhance platelet aggregation (Figure 4B) and P-selectin expression (Figure 4C) in resting platelets.

Activation of p38 MAPK is of significant importance in CD40 signaling and it could therefore act as a downstream target of Rac1 in platelets in response to sCD40L. In fact, sCD40L induced a time-dependent activation of p38 MAPK and inhibition of Rac1 with NSC23766 significantly reduced its activation, indicating that p38 MAPK does indeed act as a downstream target of Rac1 (Figure 5A). Furthermore, specific blockade of p38 MAPK with SB203580, which prevented its phosphorylation (Supplemental Figure 2), impaired sCD40L's effects on platelet P-selectin expression (Figure 5B) and aggregation (Figure 5C), thus highlighting its implication in these responses. These data establish Rac1 and its downstream effector p38 MAPK as key components involved in sCD40L signaling in platelets.

CD40^{-/-} mice show impaired platelet aggregation and shape change

Given that the effects of sCD40L on platelets are mediated through the CD40 receptor, we evaluated next its implication in platelet aggregation in response to collagen, an important platelet agonist known to induce rapid expression of membrane CD40L on the platelet surface. Interestingly, platelets from CD40^{-/-} mice displayed impaired collagen-induced platelet shape change and aggregation, as compared to platelets from WT mice (Figure 6 A and B). Indeed, we noted significant differences between these two groups, especially in the presence of collagen concentrations of 1, 2 and 5 µg/mL. Platelet shape change and aggregation of CD40^{-/-} mice in response to higher collagen concentrations (10 µg/mL) were similar to those of WT mice. These data highlight the importance of CD40 signaling in a platelet-platelet interaction setting which is known to induce the expression of membrane CD40L, as opposed to exogenous sCD40L.

Discussion

CD40L has gained much attention over the years for its involvement in the pathogenesis of atherosclerosis and numerous clinical studies show a tight association between levels of sCD40L and vascular diseases.¹⁻⁴ The vast majority of sCD40L found in plasma is believed to originate

from activated platelets and this in turn has been shown to influence platelet activation. Here, we provide novel insights into the regulation of platelet function by CD40L, as we show that sCD40L primes platelets and enhances aggregation through a CD40-mediated TRAF-2/Rac1/p38 MAPK dependant pathway. This ultimately leads to shape change and actin polymerization. Furthermore, we highlight the importance of CD40 signaling in response to platelet-platelet interactions.

To get insights into the cellular and molecular impact of sCD40L on platelet function, it was important that we first investigate its effect on platelet aggregation and activation. Soluble CD40L was unable to trigger aggregation of resting platelets or to induce activation of the $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, while it significantly increased the expression of P-selectin, in accordance with previous studies.^{14, 17, 22} This may be attributed to the fact that sCD40L alone does not affect intraplatelet calcium influx (Supplemental Figure 3) nor dense granule secretion, as assessed by ATP release and mepacrine uptake (Supplemental Figure 4), which are necessary for integrin activation and platelet aggregation. However, we found that sCD40L strongly enhanced platelet aggregation, P-selectin expression and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in response to sub-threshold concentrations of platelet agonists, indicating that it rather acts as a broad and potent primer of platelets, such as matrix metalloproteinase-2, plasma protein growth arrest-specific 6 and stromal derived factor-1 α .²⁸⁻³⁰ Moreover, this priming phenomenon holds true for B cell proliferation, as sCD40L requires co-stimulation with interleukin-4 for immunoglobulin E secretion.^{31,32} Taken together, this would indicate that CD40L acts as an accessory, but important, element in platelet function.

One important aspect of controversy regards the identification of the platelet receptor for sCD40L. In our study, we showed by molecular and genetic approaches that sCD40L enhances platelet function by interacting with CD40. These results are in agreement with previously published data showing that sCD40L can induce platelet activation and secretion of reactive oxygen species and the chemokine RANTES through binding to CD40.^{14, 17, 22} In addition to CD40, its constitutively expressed receptor on platelets, it has been reported that sCD40L binds to $\alpha_{IIb}\beta_3$.^{13,26} However, this occurs in the presence of 40 $\mu\text{g/mL}$ of rsCD40L on preactivated platelets ($\alpha_{IIb}\beta_3$ already in its active form), which is 40 times higher than the concentration used in the present study. This may suggest that CD40 and $\alpha_{IIb}\beta_3$ constitute the high and low affinity receptors for sCD40L, respectively. However, further studies are necessary to specifically address this issue. Thus, it appears that increased levels of circulating sCD40L, as seen in ACS

patients, primes platelets via CD40, while its interaction with $\alpha_{IIb}\beta_3$ at the site of vascular injury, where higher levels of sCD40L may be generated, stabilizes platelet aggregates.

CD40 signaling in immune and endothelial cells requires its association to TRAF proteins. To our knowledge, the expression of TRAF members in platelets and their association with platelet CD40 following sCD40L stimulation, are still unknown. Here, we found that only TRAF-2 associates with CD40 upon ligation, indicating that it may be responsible for sCD40L/CD40-induced signaling in platelets. Although present in platelets, neither TRAF-1 nor TRAF-6 associated with CD40, indicating that they may rather play a role in TNF signaling. Even though CD40 contains binding sites for both TRAF-2 and TRAF-6, binding of either one is sufficient to induce activation of NF- κ B in B cells.³³ This would also hold true for platelets, as binding of TRAF-2 alone appears sufficient to trigger downstream signaling.

In platelets, Rac1 and VASP govern shape change, cytoskeletal reorganization and spreading, through lamellipodia and filopodia formation, respectively. VASP is typically phosphorylated on two main residues, Ser²³⁹ and Ser¹⁵⁷. Platelet inhibitors induce phosphorylation of both residues, while agonists that cause platelet activation trigger phosphorylation of VASP on Ser¹⁵⁷, thereby promoting anticapping activity and favoring actin polymerization and filopodia formation.^{34,35} Our finding that sCD40L promotes phosphorylation of VASP on Ser¹⁵⁷ provides evidence for its role as an inducer of shape change in platelets. As further support for the role of sCD40L in these processes, we highlight its capacity to induce activation of the small GTPase Rac1. Rac1 activation in response to sCD40L showed to be of physiological importance, given that its specific inhibition significantly reduced sCD40L's ability to potentiate platelet aggregation and P-selectin expression. Interestingly, in accordance with our results, it has been recently shown that in endothelial and WEHI 231 B cells, CD40 signaling-induced reactive oxygen species generation requires activation of Rac1.^{19,36} Moreover, in immune cells, CD40L is classically known to induce activation of MAPKs, such as p38. Here, we were able to confirm that sCD40L induces activation of p38 MAPK in resting platelets,^{17,22} and further highlight its involvement in platelet activation and aggregation as a downstream effector of Rac1 in response to sCD40L. Consistent with its role in sCD40L-induced platelet shape change and priming, p38 MAPK has been shown to be an important regulator of actin polymerization and platelet spreading.³⁷

Having shown the importance of CD40 signaling in response to sCD40L, we sought to investigate the implication of CD40 signaling in a platelet-platelet interaction setting known to

induce expression of membrane CD40L. Platelet agonists such as collagen have been shown to induce rapid expression of membrane CD40L on the platelet surface, which would therefore be available for CD40 binding. Because sCD40L acts as an important primer through its ability to induce platelet shape change, it was not surprising that CD40^{-/-} mice showed impaired platelet shape change and aggregation in response to collagen. This would strongly suggest that, as is sCD40L, membrane CD40L is also capable of inducing CD40-mediated intracellular signaling pathways, which favor platelet shape change and actin polymerization. Collagen induces platelet activation through two main receptors, GPIa/IIa and GPVI. Recently, a study by Pula and Poole reported that an intact cytoskeleton and cdc42 are essential for GPIa/IIa-induced, but not GPVI-induced, platelet aggregation.³⁸ Therefore, this could suggest that the CD40L/CD40 interaction is required for GPIa/IIa-induced platelet aggregation, while being accessory for GPVI-induced platelet aggregation, possibly explaining why platelets from CD40^{-/-} mice show impaired shape change and aggregation only in response to low collagen concentrations.

In summary, we identify a new TRAF-2/Rac1/p38 MAPK signaling pathway involved in platelet priming in response to sCD40L. This study provides novel evidence for the regulation of platelet function by sCD40L and may explain in part the link between levels of circulating sCD40L and the occurrence of cardiovascular complications. The CD40L/CD40 axis may ultimately represent a therapeutic target in the treatment of thrombo-inflammatory diseases.

Acknowledgments

We thank Mr. Louis Villeneuve for his assistance with confocal microscopy, Mrs. Line Mongeon and Dr Maryam Tabrizian for their help with scanning electron microscopy and Mr. Haydar Alturaihi for his technical help with the preparation of recombinant sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT}.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (MOP-82767 for Y.M.; and MOP-89988 for W.M.). D.Y. is a scholar from the Heart and Stoke Foundation of Canada.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Cipollone F, Chiarelli F, Davi G, Ferri C, Desideri G, Fazia M, Iezzi A, Santilli F, Pini B, Cuccurullo C, Tumini S, Del Ponte A, Santucci A, Cuccurullo F, Mezzetti A. Enhanced soluble CD40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: effect of improved metabolic control. *Diabetologia*. 2005;48:1216-1224.
2. Garlachs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;104:2395-2400.
3. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104-1111.
4. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesaro M, Sorge R, Lauro R, Violi F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2005;111:412-419.
5. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357:80-82.
6. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175:1091-1101.
7. Kroczeck RA, Graf D, Brugnani D, Giliani S, Korthuer U, Ugazio A, Senger G, Mages HW, Villa A, Notarangelo LD. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev*. 1994;138:39-59.
8. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594.
9. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:4-43.
10. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4342-4346.
11. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol*. 1999;154:229-238.

12. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 2000;156:7-14.
13. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med.* 2002;8:247-252.
14. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res.* 2003;92:1041-1048.
15. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med.* 1999;5:1313-1316.
16. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature.* 1998;394:200-203.
17. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:2428-2434.
18. Chakrabarti S, Blair P, Freedman JE. CD40-40L signaling in vascular inflammation. *J Biol Chem.* 2007;282:18307-18317.
19. Xia M, Li G, Ma J, Ling W. Phosphoinositide 3-kinase mediates CD40 ligand-induced oxidative stress and endothelial dysfunction via Rac1 and NADPH oxidase 2. *J Thromb Haemost.* 2010;8:397-406.
20. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, Ley K, Sarembock IJ. CD40 ligand promotes Mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol.* 2008;172:1141-1152.
21. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation.* 2002;106:896-899.
22. Danese S, de la Motte C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification. *J Immunol.* 2004;172:2011-2015.
23. Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ, Spoon TL, Siadak AW, Gordon M, Noelle RJ, Hollenbaugh D, Aruffo A. Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry.* 1995;34:9884-9892.

24. Yacoub D, Theoret JF, Villeneuve L, Abou-Saleh H, Mourad W, Allen BG, Merhi Y. Essential role of protein kinase C delta in platelet signaling, alpha IIb beta 3 activation, and thromboxane A2 release. *J Biol Chem*. 2006;281:30024-30035.
25. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, Wang W, White MM, Jennings LK, Jackson CW. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol*. 1995;89:380-385.
26. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble CD40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12367-12371.
27. Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, Schafer DA. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem*. 2005;280:28653-28662.
28. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med*. 2001;7:215-221.
29. Kowalska MA, Ratajczak MZ, Majka M, Jin J, Kunapuli S, Brass L, Poncz M. Stromal cell-derived factor-1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets. *Blood*. 2000;96:50-57.
30. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. *Nature*. 1997;386:616-619.
31. Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol*. 1993;150:3671-3680.
32. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, Maliszewski CR, Fanslow WC. Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med*. 1992;176:1543-1550.
33. Hostager BS, Haxhinasto SA, Rowland SL, Bishop GA. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2)-deficient B lymphocytes reveal novel roles for TRAF2 in CD40 signaling. *J Biol Chem*. 2003;278:45382-45390.
34. Chen L, Daum G, Chitaley K, Coats SA, Bowen-Pope DF, Eigenthaler M, Thumati NR, Walter U, Clowes AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1403-1408.

35. Wentworth JK, Pula G, Poole AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is phosphorylated on Ser157 by protein kinase C-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J*. 2006;393:555-564.
36. Ha YJ, Lee JR. Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol*. 2004;172:231-239.
37. Mazharian A, Roger S, Maurice P, Berrou E, Popoff MR, Hoylaerts MF, Fauvel-Lafeve F, Bonnefoy A, Bryckaert M. Differential Involvement of ERK2 and p38 in platelet adhesion to collagen. *J Biol Chem*. 2005;280:26002-26010.
38. Pula G, Poole AW. Critical roles for the actin cytoskeleton and cdc42 in regulating platelet integrin alpha2beta1. *Platelets*. 2008;19:199-210.

Figure legends

Figure 1. sCD40L enhances platelet activation and aggregation through interaction with CD40. A, Dose dependent effect of sCD40L on platelet aggregation. Platelets were preincubated with the indicated concentration of sCD40L for 30 minutes at 37°C and aggregation was induced by a priming dose of collagen (0.25 µg/mL). Upper aggregation traces show the effect of sCD40L alone (1 µg/mL). Histogram represents the mean of data of platelet aggregation in response to sCD40L alone (no agonist) or in the presence of a priming (low) dose of collagen (0.25 µg/mL), thrombin (0.02 U/mL) or ADP (5 µM). High doses of agonists (collagen 5 µg/mL, thrombin 0.5 U/mL, or ADP 20 µM) were employed as positive controls (n=5; **P*< 0.05 vs. low dose). B, Effect of sCD40L on P-selectin (CD62P) expression and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation, as assessed by flow cytometry. Left plots represent resting platelets (- collagen: gray for baseline, black for sCD40L). Right plots represent platelets in the presence of a priming concentration of collagen (+ collagen: gray for priming dose of collagen, black for priming dose + sCD40L, and white for high dose collagen alone, as positive control). Histograms represent the mean of data of plots for CD62P expression and $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in response to sCD40L alone (no agonist) or in the presence of a priming (low) dose of collagen (1 µg/mL), thrombin (0.02 U/mL) or ADP (5 µM). High doses of agonists (collagen 5 µg/mL, thrombin 0.5 U/mL or ADP 20 µM) were employed as positive controls (n=5; †*P*< 0.05 vs. baseline and **P*< 0.05 vs. low dose). C, Effect of recombinant mutant sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT} on human platelet aggregation. Platelets were incubated with 1 µg/mL of sCD40L^{R/Y} or sCD40L^{WT} for 30 minutes at 37°C and aggregation was induced by a priming dose of collagen (0.25 µg/mL). sCD40L was employed as a positive control. D, Effect of msCD40L on WT and CD40^{-/-} mouse platelet aggregation. Platelets were incubated with msCD40L (1 µg/mL) for 30 minutes at 37°C and aggregation was induced by a priming concentration of collagen (1 µg/mL). Data in parentheses shown in C and D represent the mean ± SEM of n=4.

Figure 2. sCD40L induces TRAF-2 association with CD40. A, Representative blots of lysates from resting (baseline) or sCD40L (1 µg/mL) stimulated platelets, immunoprecipitated using an anti-CD40 monoclonal antibody and analyzed by SDS-PAGE for TRAF-1, -2, -3, and -6. B, Histogram represents the mean of data of blots in A, expressed as arbitrary units of optical

density (n=5; * P < 0.05 vs. baseline). C, CD40 was immunoprecipitated from lysates of resting (baseline), or 1 μ g/mL of sCD40L^{R/Y} or sCD40L^{WT} stimulated platelets. Immunoprecipitates were then analyzed by SDS-PAGE for TRAF-2. Blot shown is representative of 4 independent experiments.

Figure 3. sCD40L induces platelet shape change and actin polymerization. A, Scanning electron micrographs of resting (baseline), sCD40L, sCD40L^{WT} and sCD40L^{R/Y} (all at 1 μ g/mL) stimulated platelets at low (top: 2,500X) and high (bottom: 30,000X) magnifications. Images are representative of 4 independent experiments. B, Actin polymerization in resting (baseline) and in sCD40L (1 μ g/mL) treated platelets, with or without 10 μ M latrunculin B (Lat), as assessed by confocal microscopy. Images are representative of 3 independent experiments. C, Platelets were preincubated with latrunculin B (10 μ M) or vehicle DMSO for 15 minutes at 37°C. Cells were then left unstimulated (control) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL) and aggregation was triggered by a priming dose of collagen (0.25 μ g/mL). D, Represents the mean of data of traces in C (n=3; * P < 0.05).

Figure 4. The Rho-GTPase Rac1 is required for sCD40L signaling. A, VASP phosphorylation and Rac1 activation were detected from platelets left untreated (baseline) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL) for the indicated time. Control experiments were performed in parallel with 1 μ g/mL of sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT} after 30 minutes stimulation. Blots are representative of 4 independent experiments. B, Effect of Rac1 inhibition on sCD40L-induced potentiation of platelet aggregation. Platelets were preincubated with the Rac1 inhibitor NSC23766 (50 μ M) or vehicle DMSO for 15 minutes at 37 °C. Cells were then left unstimulated (control) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL). Aggregation was then monitor in the presence of a priming dose of collagen (0.25 μ g/mL). Histogram represents the mean of data of aggregation traces (n=4; * P <0.05 vs. sCD40L). C, Platelets were left untreated (baseline) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL) with or without NSC23766 (50 μ M) and assessed by flow cytometry for CD62P expression. Histogram shows the mean data of overlay plot (n=3; * P < 0.05 vs. sCD40L).

Figure 5. The p38 MAPK is an important Rac1 downstream target in response to sCD40L. A, Platelets were left untreated (time 0) or stimulated with sCD40L (1 μ g/mL), with or without

NSC23766 (50 μ M), for the indicated time and assessed for p38 MAPK phosphorylation by SDS-PAGE. Results are expressed as fold increase in optical density (O.D.) over time 0 (n=4; * P <0.05). B, Platelets were left unstimulated (baseline) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL), with or without the p38 MAPK inhibitor SB203580 (5 μ M) and assessed for CD62P by flow cytometry. Histogram represents the mean of data of overlay plot (n=5; * P <0.05 vs. sCD40L). C, Platelets were preincubated with SB203580 (5 μ M) or vehicle DMSO for 15 minutes at 37°C. Cells were then left unstimulated (control) or incubated with sCD40L (1 μ g/mL), and aggregation was then induced by a priming dose of collagen (0.25 μ g/mL). Histogram represents the mean of data of aggregation traces (n=4; * P <0.05 vs. sCD40L).

Figure 6. CD40^{-/-} mice show impaired platelet aggregation and shape change. A, Representative platelet aggregation traces from wild type (WT) and CD40^{-/-} mice in response to 1, 2, 5 and 10 μ g/mL collagen. B, Histograms represent mean of data of collagen-induced (1, 2, 5 and 10 μ g/mL) platelet shape change from wild type (WT) and CD40^{-/-} mice. Both maximal shape change (%) and slope of shape change were measured by optical aggregometry, as described in Methods (n=4; * P <0.05 vs. WT).

Figure 1

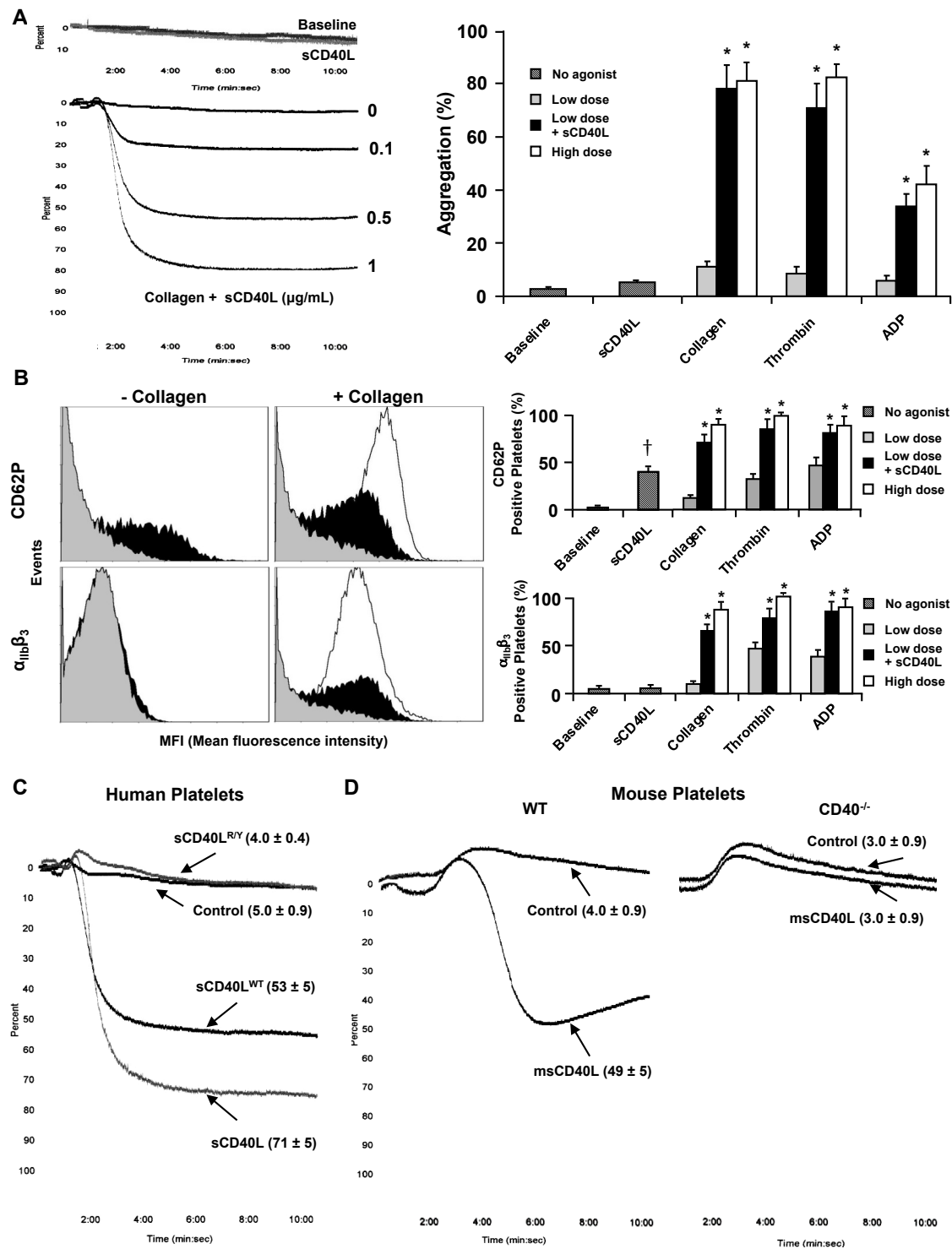


Figure 2

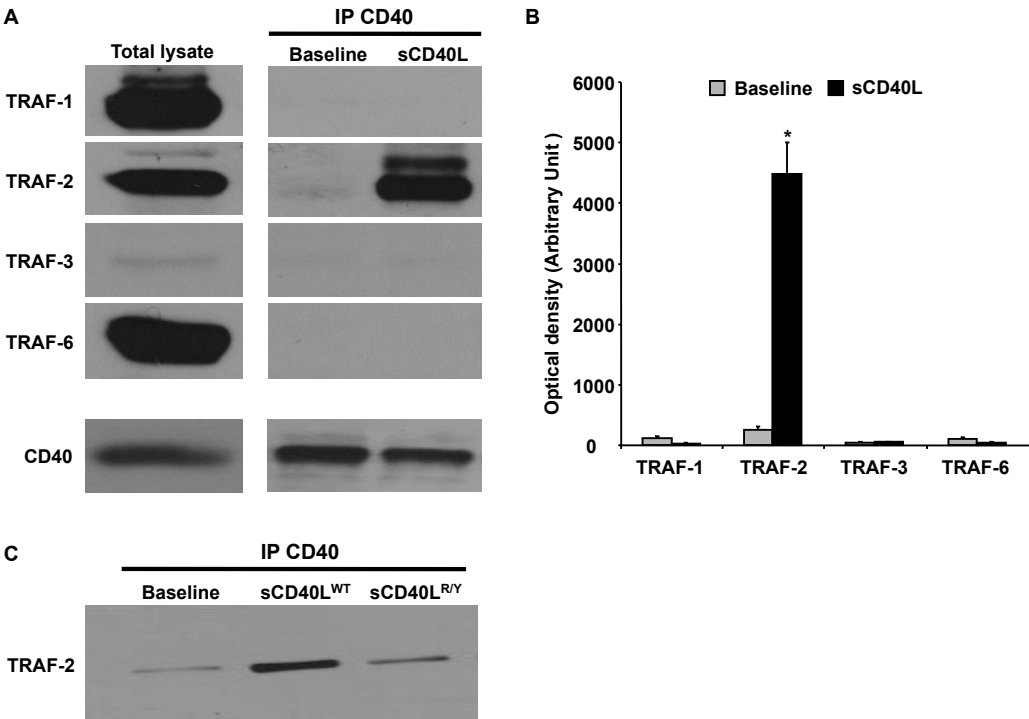


Figure 3

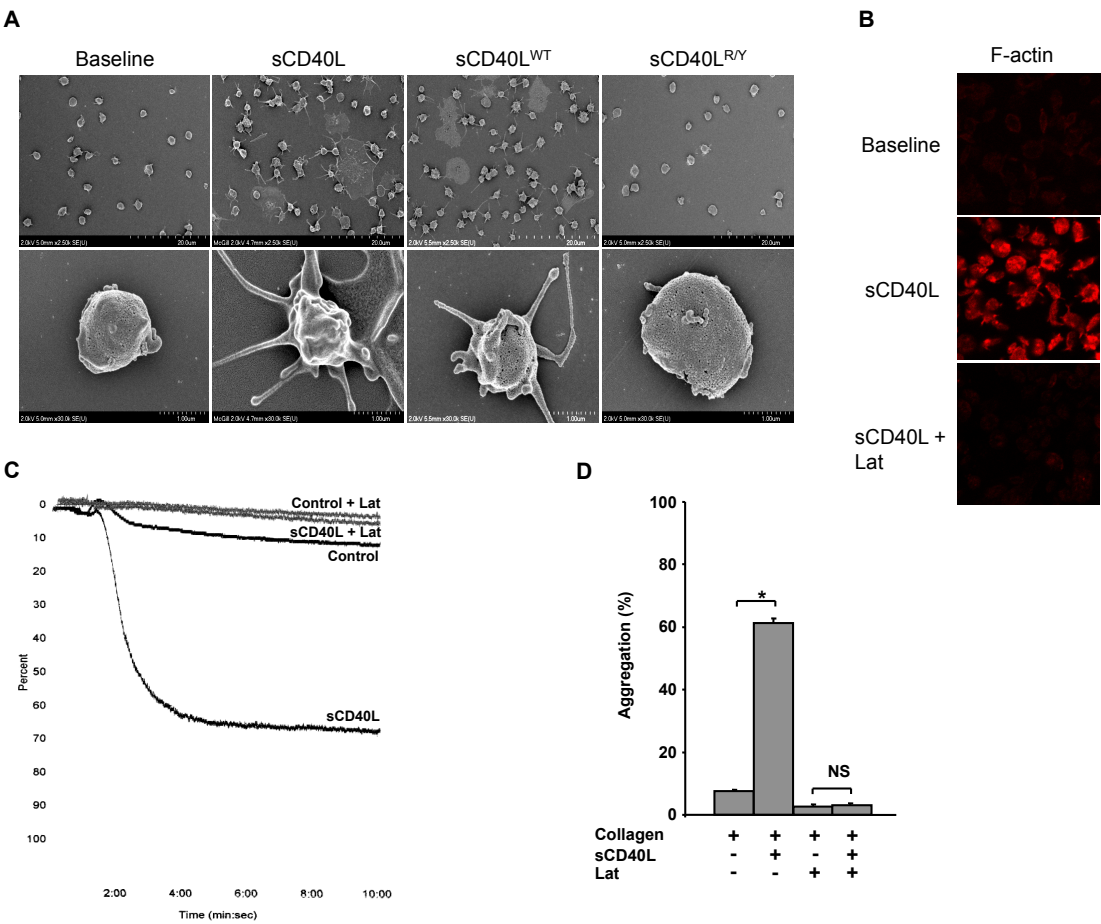


Figure 4

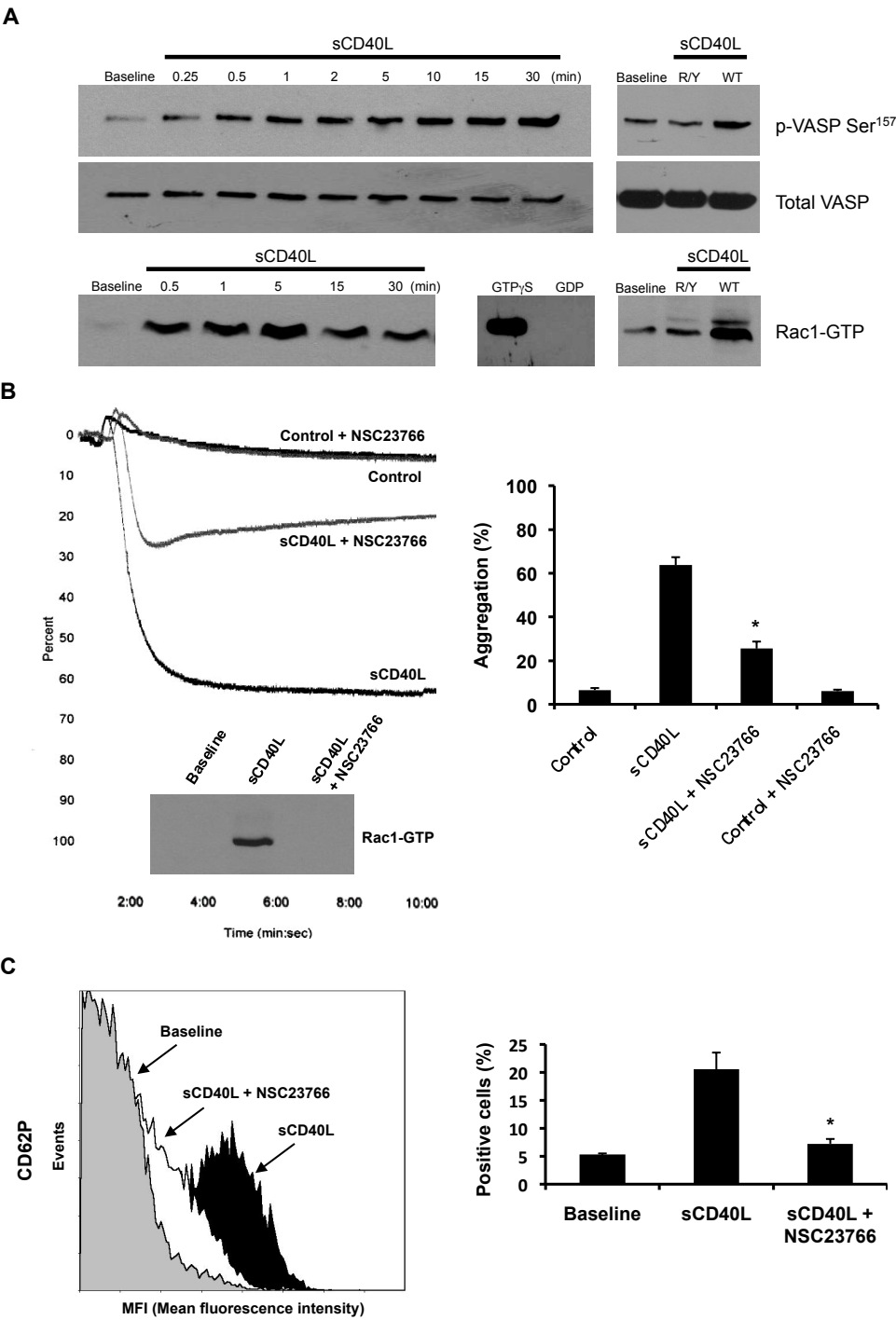


Figure 5

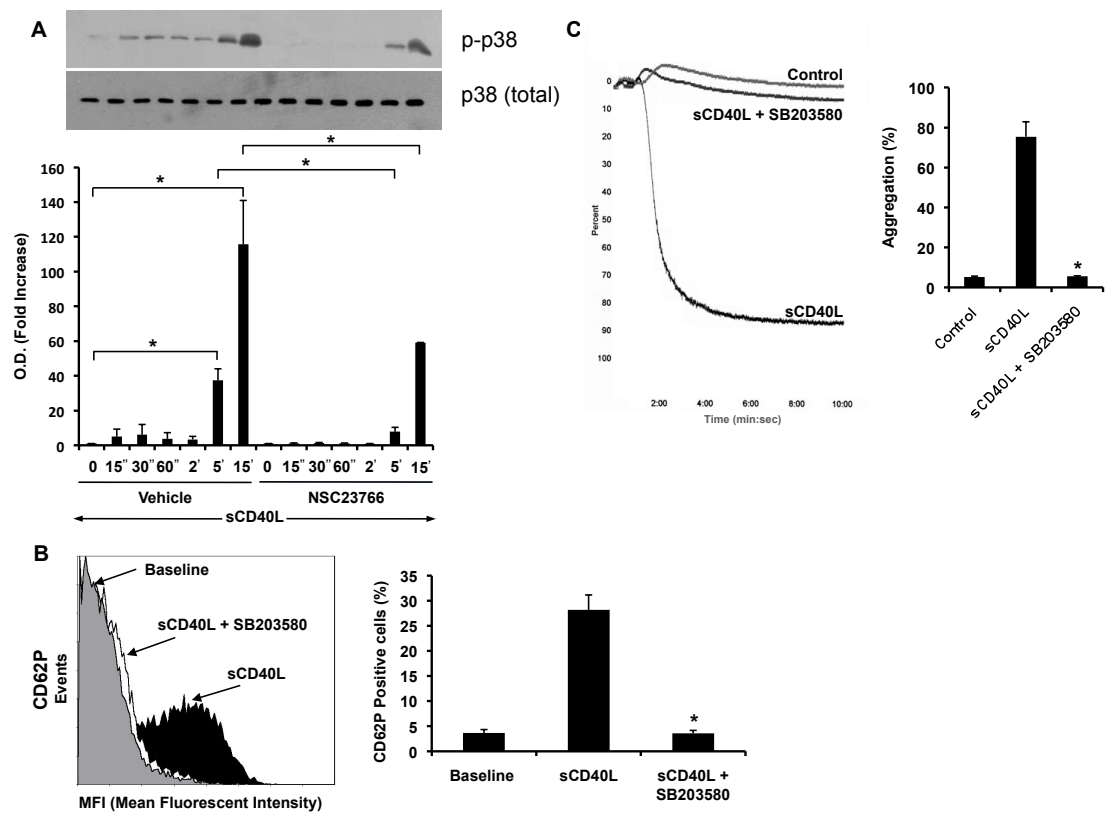
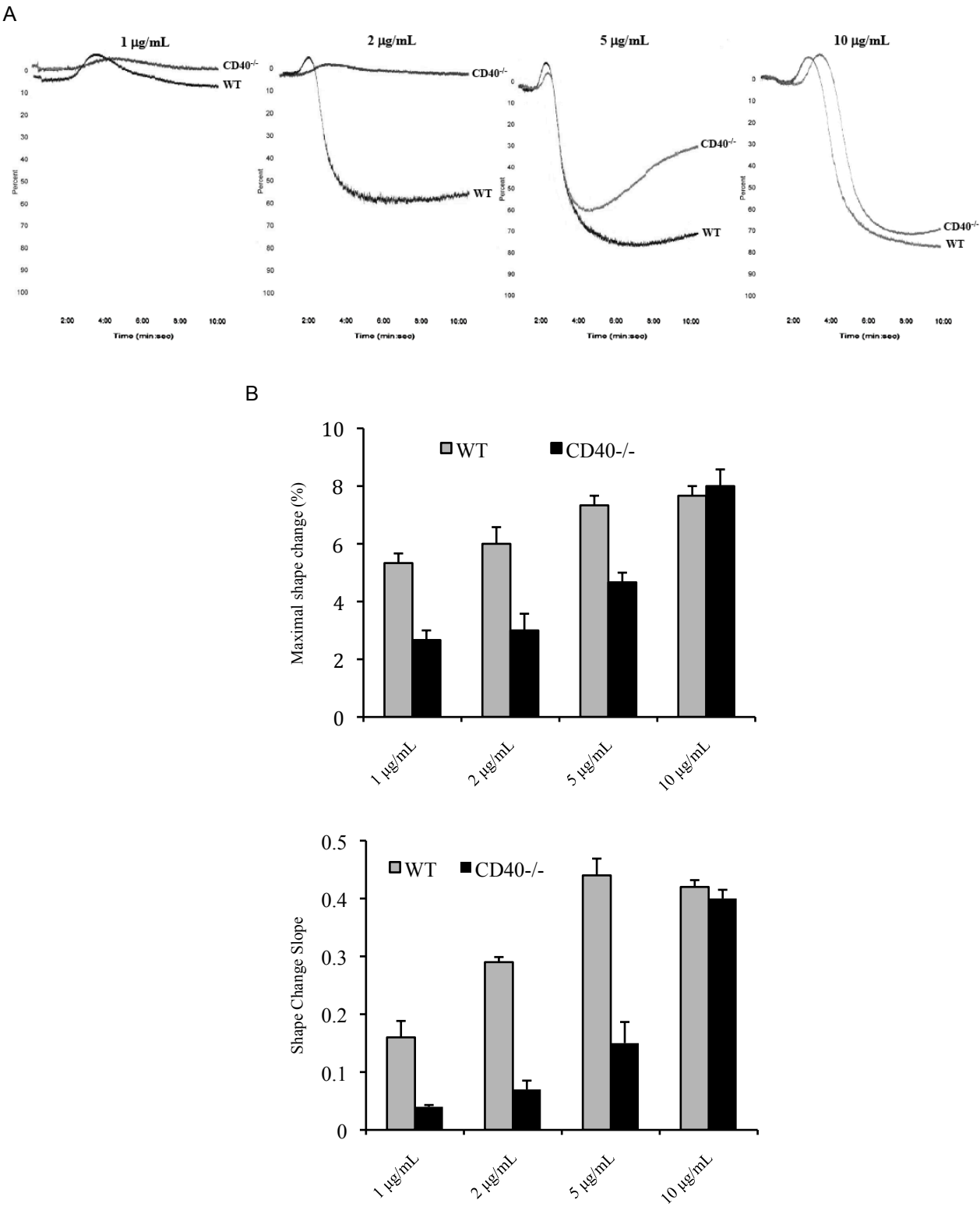
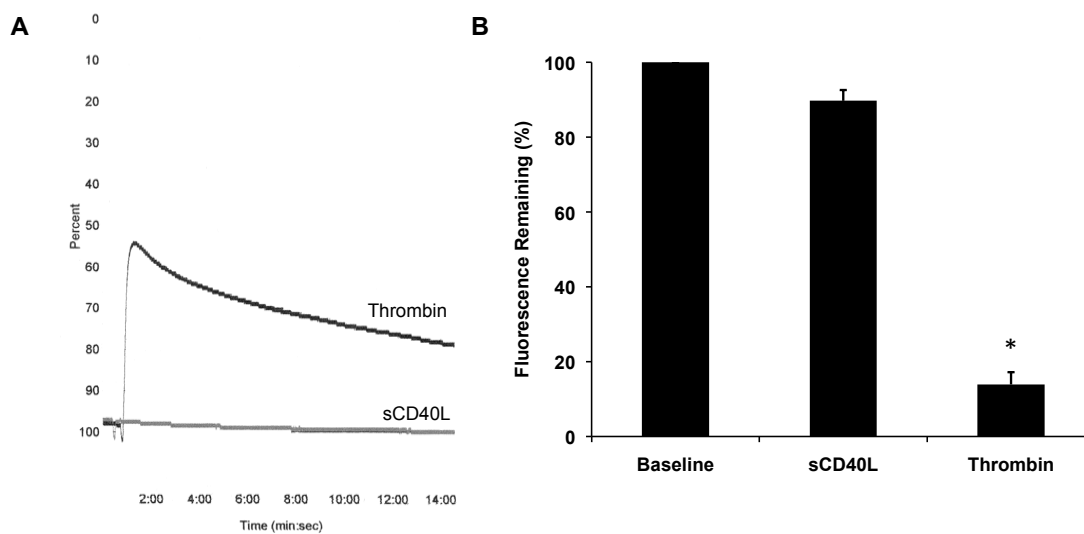


Figure 6

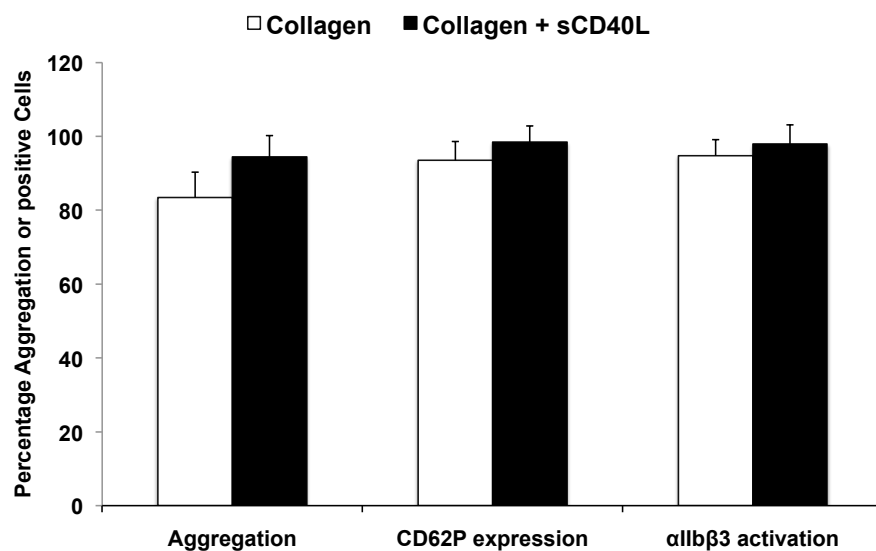


Supplemental Figure 1

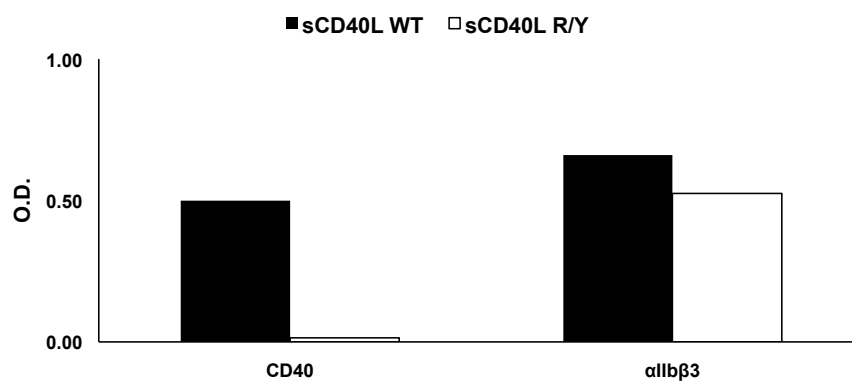


Supplemental Figure 1: Effect of sCD40L on platelet dense granule secretion. A, ATP secretion as measured by Luciferase assay (Chrono-Lume, Chrono-log). Results are expressed as a measure of increase in luminescence. Blot is representative of 3 independent experiments. B, Dense granule secretion was evaluated by measuring the loss of mepacrine fluorescence following activation by sCD40L (1 μ g/mL) or thrombin (0.5 U/mL); in comparison to untreated cells which was set as 100% fluorescence (n=3; * P < 0.05 vs. baseline).

Supplemental Figure 2

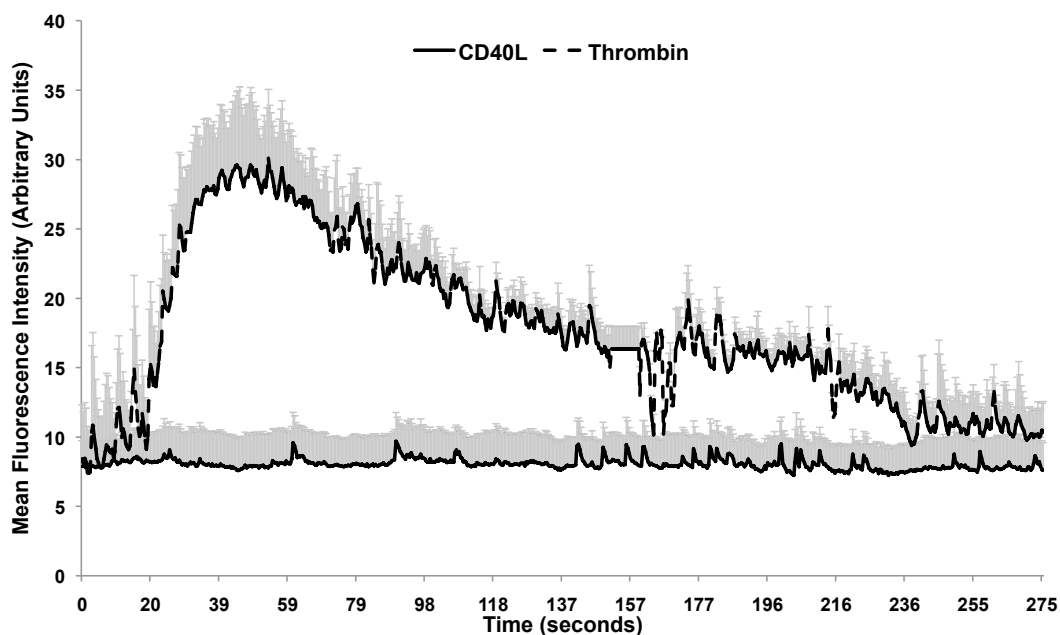


Supplemental Figure 2: Effect of sCD40L on high dose collagen. Washed platelets were incubated with sCD40L (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or left untreated for 30 minutes at 37°C, then stimulated with collagen (aggregation: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; flow cytometry: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and assessed by optical aggregometry and flow cytometry for CD62P and $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ activation, as described in materials and methods.

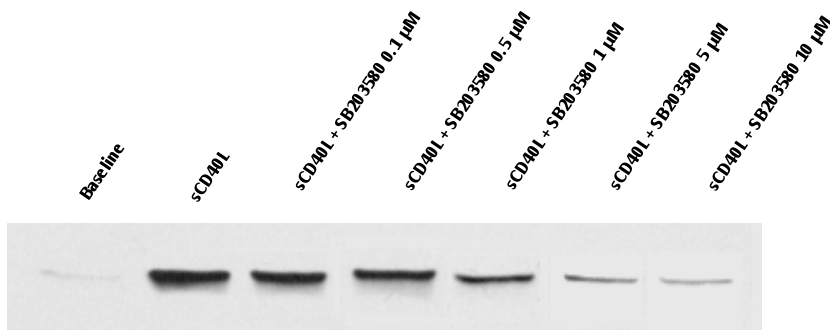
Supplemental Figure 3

Supplemental Figure 3: Specific binding of CD40 ligand to CD40- or αIIbβ3-coated well plates. Plates were coated with 4 μg of soluble hCD40 or αIIbβ3 overnight at room temperature. After extensive washing, plates were blocked with 1% BSA, then recombinant soluble hsCD40L wild type (WT) or hsCD40L R/Y was added overnight at a concentration of 100 ng/mL. A polyclonal anti-hCD40L-biotinylated antibody was used followed by addition of streptavidin-HRP. The signal was detected by addition of TMB substrate. The reaction was halted by the addition of 1N H₂SO₄. Optical density (O.D.) was then measured by spectrophotometry.

Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 4: Effect of sCD40L on intracellular calcium flux. Intracellular calcium was measured by Fluo-4 AM fluorescence by real-time confocal microscopy following stimulation of platelets with either sCD40L (1 $\mu\text{g/mL}$) or thrombin (0.5 U/mL), as described in materials and methods. Tracings are representative of 3 independent experiments.

Supplemental Figure 5**Supplemental Figure 5: Effect of SB203580 (0.1 μ M -10 μ M) on sCD40L-induced p38 MAPK activation.**

Resting platelets were preincubated with the indicated concentration of SB203580 for 15 minutes at 37°C or left untreated, and then stimulated with sCD40L (1 μ g/mL). Total platelet lysates were analyzed by SDS-PAGE for phospho-p38 MAPK. Blot shown is representative of 3 independent experiments.

Mise en contexte pour le deuxième article :

L'augmentation des niveaux circulants du CD40L soluble exacerbe la formation du thrombus par l'entremise du CD40

Dans notre première étude, nous avons démontré que le sCD40L augmente l'activation et l'agrégation plaquettaire *in vitro*, par l'entremise d'une voie signalétique TRAF-2/Rac1/p38 MAPK CD40-dépendante.

Tel que mentionné auparavant, il existe une corrélation étroite entre les niveaux circulants du sCD40L et l'incidence des ACS, tels que l'angine instable et l'infarctus du myocarde. Cependant, il n'est toujours pas clair si l'augmentation de ces niveaux chez les patients coronariens est la conséquence d'une augmentation prématuré de l'activation plaquettaire ou si cette augmentation est la cause du développement de ces syndromes (ou même une combinaison des deux). À ce jour, aucune étude n'a évalué l'impact direct de l'augmentation des niveaux du sCD40L circulant sur la formation du thrombus *in vivo*.

Cette étude fut donc entreprise pour évaluer l'impact physiologique du sCD40L sur la fonction plaquettaire, en particulier l'agrégation plaquettaire en sang complet, l'adhésion plaquettaire sous conditions de flux et la formation du thrombus *in vivo* chez la souris.

Contribution des auteurs :

Daniel Yacoub : Planification et exécution des expériences d'agrégation et de temps de thrombose *in vitro* (Figure 1), de perfusion *ex-vivo* en sang complet (Figure 2), et de thrombose *in vivo* chez la souris (Figures 3-5). Rédaction et correction de l'article.

Ahmed Hachem : Planification et exécution des expériences de perfusion *ex-vivo* en sang complet (Figure 2), ainsi que correction de l'article.

Jean-François Théorêt : Correction de l'article.

Marc-Antoine Gillis : Exécution du modèle de thrombose *in vivo* chez la souris (Figures 3-5).

Walid Mourad : Codirection générale.

Yahye Merhi : Direction générale.

Enhanced Levels of Soluble CD40L Exacerbate Thrombus Formation and Leukocyte Infiltration in a CD40-Dependent Manner

Daniel Yacoub, MSc; Ahmed Hachem, MSc; Jean-François Théorêt, PhD; Marc-Antoine Gillis, MSc; Walid Mourad, PhD; Yahye Merhi, PhD

Short title: Soluble CD40L and thrombus formation

Subject Codes: [92] Platelets,
[172] Arterial Thrombosis
[178] Aggregation
[188] Thrombosis risk factors

Word count: 4406

From the Research Center, Montreal Heart Institute and Université de Montréal, Faculty of Medicine (D.Y., A.H., J-F.T., M-A.G., Y.M.) and CR-CHUM, Université de Montréal (W.M.), Montreal, Quebec, Canada.

D.Y. and A.H. contributed equally to this work

Correspondence to Yahye Merhi, PhD, Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8; Tel: +514 376-3330 ext. 3035, Fax: +514 376-1355.

Abstract

Background-CD40L is an inflammatory molecule that predicts cardiovascular events. We have previously shown that sCD40L enhances agonist-induced platelet activation and aggregation through a CD40-dependant TRAF-2/Rac1/p38 MAPK signaling pathway. However, the physiological impact of enhanced levels of circulating sCD40L on thrombus formation has yet to be investigated.

Methods and Results-sCD40L dose-dependently enhances whole blood platelet aggregation and accelerates platelet function analyzer (PFA)-100 closure times in a CD40-dependant fashion. Preincubation of whole blood with sCD40L significantly increases platelet adhesion and deposition to collagen in an *ex-vivo* perfusion system under flow. Moreover, in a ferric chloride-induced murine arterial thrombosis model, infusion of sCD40L exacerbates thrombus formation in wild type (WT), but not in CD40^{-/-} mice. This was further associated with increased leukocyte infiltration within the thrombus mass of WT mice treated with sCD40L, as determined by CD45 immunostaining and optical quantification of histological sections post-thrombosis.

Conclusions- These data show for the first time a direct positive correlation between levels of circulating sCD40L and platelet adhesion and thrombosis. Thus, sCD40L is an important platelet primer predisposing platelets to enhanced thrombus formation in response to vascular injury. This may explain the link between circulating levels of sCD40L and the occurrence of cardiovascular disease.

Key Words: platelets ■ thrombosis ■ inflammation ■ CD40L

Introduction

CD40L is a 48-kDa trimeric transmembrane protein belonging to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily originally identified on cells of the immune system, such as T lymphocytes.^{1,2} The interaction of CD40L with its respective receptor on B cells, CD40, is of critical importance for immunoglobulin isotype switching during the immune response, as demonstrated by the pathophysiological manifestations seen in patient suffering from the X-linked hyper-immunoglobulin-M syndrome.³ The implication of the CD40/CD40L axis is however not restricted to adaptive immunity, as it is also broadly expressed by cells of the vasculature and regulates numerous inflammatory reactions. The CD40/CD40L dyad has mainly been shown to play a predominant role in the pathogenesis of atherosclerosis,^{4,5} primary through its involvement in the up-regulation of cell adhesion molecules, pro-inflammatory cytokines, growth factors, matrix metalloproteinases and procoagulants.⁶⁻⁹

The vast majority of soluble CD40L (sCD40L) found in plasma is believed to originate from an enzymatic cleavage of the membrane-bound form of the protein at the surface of activated platelets.¹⁰ The soluble form of CD40L remains a functional trimer, as it has been shown to bind CD40 and $\alpha_{IIb}\beta_3$ and induce cellular responses on various cells, such as endothelial cells and platelets.^{6,11,12} Circulating levels of sCD40L have now emerged as strong indicators of cardiovascular risk, as there appears to be a significant correlation between levels of the molecule and the occurrence of acute coronary syndromes (ACS).^{13,14}

We have previously shown that sCD40L enhances platelet activation and aggregation through a CD40-mediated TNF Receptor Associated Factor (TRAF)-2/Rac1/p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.¹⁵ Andre and al. have shown that CD40L^{-/-} mice exhibit unstable thrombi and that this deficiency can be overcome by infusing mice with sCD40L.¹¹ Nevertheless, the effect of constitutively enhanced levels of circulating sCD40L on platelet function *in vivo*, in particular thrombus formation, remains undetermined. Platelets are major contributors to the development and the progression of complications associated with ACS and the demonstration of a direct link between the two could provide significant insights into both the pathophysiology and the management of cardiovascular diseases. Here, we show that elevated levels of sCD40L exacerbate whole blood platelet aggregation, platelet function analyzer (PFA)-100 closure times, platelet adhesion to collagen under flow, thrombus formation and leukocyte infiltration, in a CD40-dependant fashion.

Methods

This study has been approved by the human and animal ethical committees of the Montreal Heart Institute. All human subjects gave informed consent and were free from drugs interfering with platelet function for at least 10 days prior to experiments.

Human and mouse soluble CD40L

Recombinant human soluble CD40L (sCD40L) was obtained from R&D systems (Minneapolis, MN), while recombinant mouse soluble CD40L (msCD40L) came from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Recombinant human mutant sCD40L^{R/Y} (Arginin (R) 203 for Alanin and Tyrosin (Y) 145 for Alanin) and its wild type counterpart sCD40L^{WT} were generated as previously described.¹⁵

Animals

Age- and sex-matched wild type (WT) and CD40^{-/-} mice, both on C57BLK/J6 background, were purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and housed under pathogen free conditions. Handling and care of animals were in compliance with guidelines established by the animal care and ethical committee of the Montreal Heart Institute.

Whole blood platelet aggregation

Human venous blood was drawn in buffered sodium citrate vacutainers (BD Biosciences, Mississauga, ON) and aggregation was monitored on a 4-channel whole blood aggregometer (Chronolog Corp, Havertown, PA) under shear (1000 rpm) at 37°C, according to the manufacturer's instructions. Briefly, whole blood was preincubated with sCD40L (all forms) under static conditions at 37°C for 30 minutes, diluted 1:1 with saline solution and aggregation was triggered by addition of a priming dose of collagen (0.25 µg/mL, Chronolog Corp). Traces were recorded until stabilization of platelet aggregation was reached and results are expressed as the change in electrical impedance (ohms).

Closure time measurements

Human whole blood was drawn in buffered sodium citrate vacutainers (BD Biosciences) and preincubated with sCD40L (sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT}) for 30 minutes at 37°C. Closure time

measurements (in seconds) were then assessed with the platelet function analyzer (PFA)-100 system (Siemens, Marburg, Germany) with the use of collagen/epinephrine cartridges (Siemens), according to the manufacturer's instructions.

Platelet adhesion

Platelet adhesion to collagen under flow was assessed in an *ex-vivo* perfusion system, as previously described.¹⁶ Briefly, 2 ml of sodium citrate anticoagulated human whole blood was preincubated with sCD40L for 30 minutes at 37°C and labelled with 10 µg/mL Rhodamine 6G (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C. Stained samples were then perfused simultaneously in glass capillaries (0.2 x 2.0 mm I.D., Fiber Optic Center Inc., Bedford, MA), pre-coated overnight at 4°C with 100 µg/mL of fibrillar equine type 1 collagen (Chronolog), at a shear rate of 300 s⁻¹ using a KD scientific syringe pump (Fisher Scientific, Ottawa, ON). After a washing step, platelet deposition images were captured using a digital Camera (Scion Corp., Frederick, MD) connected to a Nikon Diaphot 200 epifluorescence microscope (Plan 10x 0.25, Mississauga, ON). The percentage of platelet-covered surface, which is representative of platelet adhesion, was then quantified by morphometric analysis using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Thrombosis model

The effect of sCD40L on thrombus formation was determined in a FeCl₃ mouse carotid injury model, as previously described.^{16,17} Briefly, anesthetized C57BL6 WT and CD40^{-/-} mice were injected with sCD40L (0.25 mg/Kg) through the jugular vein, 5 minutes prior to FeCl₃ (4%) injury of the right carotid artery, and blood flow and time to thrombotic occlusion (blood flow of 0 mL/minute) were measured with the aid of a miniature ultrasound flow probe (0.5 VB 552, Transonic Systems Ithaca, NY) interfaced with a flow meter (T206, Transonic Systems) and a computer-based data acquisition program (Iox 2.2.17.19, Emka, Falls Church, VA).

Histology and Immunostaining

Following *in vivo* thrombosis measurements in mice, injured and contralateral non-injured carotid arteries were excised, fixed in 10% buffered formalin and analyzed by hematoxylin and eosin staining, or CD45 immunostaining for leukocytes infiltration within the thrombus mass, as previously described.¹⁶ Briefly, sections were embedded in paraffin, sectioned at 6 microns, and

stained with hematoxylin and eosin, or an anti-CD45 antibody (Santa Cruz, Santa Cruz, CA). Samples were visualized using an Olympus BX60 microscope (Olympus imaging America Inc, Center Valley, PA) and images were captured with a Retiga 2000R camera (QImaging Corporation, Surrey, BC) and visualized through the Image Pro Plus 6.2 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Measurement of mouse plasmatic sCD40L

Blood was collected by cardiac puncture 5 minutes following infusion of sCD40L (prior to thrombosis) into the jugular vein of mice. Whole blood was immediately centrifuged at 14,000 g for 5 minutes and mouse plasmatic sCD40L was measured by ELISA (Bender MedSystems, San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Statistical comparisons were done using a one-way ANOVA, followed by a Dunnetts-*t*-test for comparison against a single group. Data with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

sCD40L enhances whole blood platelet aggregation and accelerates PFA-100 closure times

We have previously shown that sCD40L enhances agonist-induced washed platelet aggregation through CD40 binding.¹⁵ Because whole blood aggregation represents a more physiological approach to evaluate platelet function, given the presence of leucocytes and coagulation factors, it was important to first assess the impact on sCD40L in this setting. As expected, sCD40L alone was unable to trigger whole blood platelet aggregation, while its significantly and dose-dependently enhanced aggregation in the presence of a priming dose of collagen (0.25 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 1A). Moreover, incubation of whole blood with sCD40L^{R/Y}, which is mutated to specifically lack binding to CD40, failed to elicit such responses, while its recombinant counterpart sCD40L^{WT} showed similar effects to those of sCD40L (Figure 1B & 1C). PFA-100 closure times have also been widely employed as a useful tool to measure primary hemostasis. As shown in Figure 1D, preincubation of whole blood with sCD40L, but not sCD40L^{R/Y}, significantly accelerates closure times to collagen/epinephrine, indicative of platelet priming or pre-activation

prior to onset of platelet adhesion and aggregation under shear. These data show that sCD40L enhance *in vitro* platelet function in a CD40-dependant manner.

sCD40L enhances platelet adhesion to collagen under flow

Platelet adhesion to collagen was then assessed in an *ex-vivo* perfusion system under flow (shear rate of 300 s^{-1}), as it represents a fundamental aspect of platelet function and thrombus formation. Figure 2 shows that perfusion of whole blood to glass capillaries coated with a priming concentration of collagen ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) resulted in a modest adhesion and deposition of platelets to the surface (15% surface coverage), which was further reduced by the $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ integrin antagonist Abciximab (6% surface coverage). In contrast, pre-incubation of whole blood with sCD40L prior to perfusion significantly enhanced platelet adhesion to collagen to 45% surface coverage. In order to confirm CD40 specificity, Figure 2 also shows that platelet adhesion to collagen was unaffected by sCD40L^{R/Y} (14% surface coverage).

sCD40L exacerbates thrombus formation *in vivo*

To date, no direct correlation between circulating levels of sCD40L and thrombosis has been established, and this could be of important clinical and pathophysiological relevance. In order to explore this aspect, we injected sCD40L (0.25 mg/kg or approximately $5\text{ }\mu\text{g/mouse}$) into WT and CD40^{-/-} mice prior to vascular injury, thereby enhancing plasma levels to $47.5 \pm 3.7\text{ ng/mL}$ ($n=4$), and assessed thrombus formation. Infusion of sCD40L into WT mice significantly exacerbated thrombus formation, in comparison to vehicle-treated mice, in which occlusion was only partial (Figure 3; thrombosis data, and Figure 4; histology). Indeed, the times required to achieve 20%, 40% and 80% occlusion were significantly shorter in sCD40L-treated mice, in comparison to vehicle-treated mice, where 40% and 80% occlusion were never achieved (Figure 3B). Interestingly, CD40^{-/-} mice were protected from increased levels of circulating sCD40L, as no significant differences in thrombosis between treated and non-treated groups were observed (Figure 3 and 4), confirming the *in vivo* contribution of the CD40 receptor in sCD40L-induced exacerbation of thrombus formation. These results establish a direct *in vivo* correlation between circulating levels of sCD40L and arterial thrombosis, while highlighting the requirement of the CD40 receptor in this process.

sCD40L enhances leukocyte infiltration within the thrombus mass

Since we have previously shown that sCD40L induces surface expression of P-selectin on platelets,¹⁵ and due to its involvement in platelet/leukocyte interactions, we sought to determine the extent of leukocyte infiltration within the thrombus mass of animals, a well-established aspect of hemostasis known to potentiate thrombus formation.¹⁸ Leukocyte infiltration, as measured by CD45 immunostaining (Figure 5A) and optical quantification of histological sections post-thrombosis (Figure 6B), was significantly increased in mice that received sCD40L, averaging approximately 14 leukocytes/thrombus section, in comparison to approximately 3 leukocytes/thrombus section in control mice. Moreover, infusion of sCD40L into CD40^{-/-} mice unaltered the extent of leukocyte infiltration within the thrombus mass of these animals, further supporting the importance of CD40 in this process.

Discussion

The CD40/CD40L dyad is a critical regulator of adaptive immunity and has also gained much attention over the years for its involvement in the pathogenesis of atherosclerosis.¹⁹ We have previously shown that sCD40L enhances agonist-induced platelet activation and aggregation through a CD40-dependant TRAF-2/Rac1/p38 MAPK signaling pathway.¹⁵ Enhanced levels of circulating sCD40L are associated with increased cardiovascular risk, albeit a direct correlation between plasmatic concentrations of the molecule and *in vivo* thrombus formation has not been demonstrated. Here we provide strong evidence that elevated levels of sCD40L exacerbate whole blood platelet aggregation, PFA-100 closure times and platelet adhesion to collagen under flow, as well as thrombus formation and leukocyte infiltration, in a CD40-dependant manner.

Whole blood aggregation is a useful and physiological approach to evaluate platelet function,²⁰ given the interplay that takes place between platelets, leukocytes and the coagulation factors during hemostasis,²¹ all of which present in whole blood. When employed as a sole agonist, sCD40L was unable to induce whole blood platelet aggregation, in accordance with our previously published results showing that sCD40L primes platelet without inducing activation of $\alpha_{IIb}\beta_3$.¹⁵ However, sCD40L significantly enhanced whole blood platelet aggregation in the presence of a priming dose of collagen or ADP (data not shown), indicating that sCD40L can also influence platelet function in whole blood. To further confirm the impact of sCD40L on platelet function in whole blood, we were also able to show that it significantly accelerates PFA-

100 closure times, which is a measurement of all three phases of primary hemostasis; platelet adhesion, activation and aggregation.²²

Platelet adhesion represents the first step of hemostasis and is an essential element of thrombus formation.²³ Upon contact with components of the sub-endothelial matrix, such as collagen, platelets rapidly change shape and form filopodia and lamellipodia, which facilitates their spreading and adhesion.²⁴ Because we have previously shown that CD40 signaling leads to shape change in platelets,¹⁵ we sought to evaluate the impact of sCD40L on platelet adhesion to collagen in an *ex-vivo* perfusion system under flow. Not surprisingly, we found that pre-incubation of whole blood with sCD40L enhances platelet adhesion and deposition to collagen, most likely through pre-activation and priming of platelets having already changed shape prior to perfusion. Platelet adhesion and thrombus formation are tightly linked, and these results could partly explain the increase in thrombosis seen in mice that were infused with sCD40L prior to vascular injury. Enhanced platelet activation, priming, adhesion and thrombus formation may all concomitantly explain the link between level of circulating sCD40L in patients and the occurrence of ACS.

Whether enhanced levels of sCD40L seen in patients with ACS are a consequence of increased platelet activation or a predetermining cause of these complications (or perhaps both) is still unknown. Here, we provide novel evidence demonstrating a direct correlation between enhanced levels of sCD40L and thrombosis. Mice that received sCD40L prior to vascular injury showed increased thrombus formation, indicating that they were predisposed to thrombotic stimulus. Our study adds new insights to a previous work showing that CD40L^{-/-} mice develop unstable thrombi and that this deficiency can be overcome by infusion of 1.6 mg/kg sCD40L in a $\alpha_{IIb}\beta_3$ -dependent manner.¹¹ Here, a different approach was employed, as we increased circulating levels of sCD40L in mice to approximately 50 ng/mL (0.25 mg/kg), in order to mimic conditions similar to those seen in patients with ACS. In this experimental setting, sCD40L was shown to exacerbate thrombosis in WT but not in CD40^{-/-} mice, indicating that enhanced levels of sCD40L prime resting platelets in a CD40-dependent-manner, predisposing them to enhanced thrombus formation. Since CD40^{-/-} mice do not show a defect in thrombus formation, it is likely that CD40 is not essential for platelet hemostasis in the absence of significant levels of sCD40L, but rather has a pathological importance in atherothrombosis in the presence of elevated levels of circulating sCD40L, as seen in patients with ACS.

Given that sCD40L induces platelet P-selectin expression, which is involved in platelet/leukocyte interactions and stabilization of thrombus mass,^{25,26} we measured the extent of leukocyte infiltration within the thrombus. We found significantly more leukocytes within the thrombus of sCD40L-treated mice, presumably accounting for the increase in thrombus formation seen in these animals, in addition to enhanced platelet predisposition to activation and aggregation in response to vascular injury.

Elevated levels of sCD40L are associated with increased cardiovascular risk, as seen in patients with ACS, such as unstable angina²⁷ and acute myocardial infarction.¹⁴ However, the relative importance of the soluble form versus the membrane-bound form in thrombus formation is still unknown. It is likely that both forms are involved in primary hemostasis, while under pathological conditions, the soluble form may play a more predominant role by favoring platelet priming and exacerbating thrombosis. Nevertheless, the involvement of CD40L in atherogenesis, thrombus formation, platelet-mediated inflammation, and plaque destabilization makes it a potential therapeutic target in atherothrombosis. Accordingly, it would be pertinent for future clinical studies to evaluate the degree of platelet priming in ACS patients, perhaps through specific sCD40L-induced cellular events, such as platelet TRAF-2 association with CD40. Hence, a direct clinical link between sCD40L and platelet function could be established for pharmacological targeting.

In summary, this study highlights the relevance of sCD40L in a pathophysiological setting of platelet function and thrombus formation. Indeed, enhanced levels of sCD40L exacerbate platelet adhesion, aggregation and thrombus formation and leukocyte infiltration in response to vascular injury, in a CD40-dependant manner. These data provides novel evidence for the regulation of platelet function by sCD40L and may explain in part the link between levels of circulating sCD40L and the occurrence of cardiovascular complications. The CD40L/CD40 axis may ultimately represent a therapeutic target in the treatment of thrombo-inflammatory diseases.

Acknowledgments

The authors thank Mr. Haydar Alturaihi for his technical help with the preparation of recombinant sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT}.

Sources of Funding

This study was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research (MOP-82767 for Y.M.; and MOP-89988 for W.M.). D.Y. is a scholar from the Heart and Stroke Foundation of Canada.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*. 1992;357:80-82.
2. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4⁺ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175:1091-1101.
3. Hill A, Chapel H. X-linked immunodeficiency. The fruits of cooperation. *Nature*. 1993;361:494.
4. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Koteliansky VE, Flavell RA. Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med*. 1999;5:1313-1316.
5. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature*. 1998;394:200-203.
6. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594.
7. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS. CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4342-4346.
8. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a CD40L-dependent mechanism: implications for tubule formation. *Am J Pathol*. 1999;154:229-238.
9. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*. 2000;156:7-14.
10. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:896-899.
11. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*. 2002;8:247-252.
12. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*. 2003;92:1041-1048.

13. Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG. Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;104:2395-2400.
14. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104-1111.
15. Yacoub D, Hachem A, Theoret JF, Tabrizian M, Mourad W, Merhi Y. CD40L primes platelets and enhances agonist-induced platelet activation and aggregation through a CD40-dependant TRAF-2/Rac1/p38 MAPK signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol (under review)*. 2010.
16. Abou-Saleh H, Yacoub D, Theoret JF, Gillis MA, Neagoe PE, Labarthe B, Theroux P, Sirois MG, Tabrizian M, Thorin E, Merhi Y. Endothelial progenitor cells bind and inhibit platelet function and thrombus formation. *Circulation*. 2009;120:2230-2239.
17. Dieude M, Gillis MA, Theoret JF, Thorin E, Lajoie G, Levine JS, Merhi Y, Rauch J. Autoantibodies to heat shock protein 60 promote thrombus formation in a murine model of arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2009;7:710-719.
18. Shantsila E, Lip GY. The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. *Thromb Haemost*. 2009;102:916-924.
19. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EAL, Daemen JAP, Lutgens E. The multi-functionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009;102:206–214.
20. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol*. 2009;103[suppl]:20A–26A.
21. Hathcock JJ. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1729-1737.
22. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in-vitro platelet function analyser: PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(Suppl 2):106– 112.
23. Andrews RK, Berndt MC. Platelet adhesion: a game of catch and release. *J Clin Invest*. 2008;118:3195-3207.
24. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2009;7(Suppl 1):17-20.
25. Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1321-1324.

26. Furie B. P-selectin and blood coagulation: it's not only about inflammation anymore. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25;877-878.
27. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation.* 1999;100:614-620.

Figure legends

Figure 1. sCD40L enhances whole blood platelet aggregation and accelerates PFA-100 closure times.

A, Dose dependent effect of sCD40L on whole blood platelet aggregation. Blood was preincubated with the indicated concentration of sCD40L for 30 minutes at 37°C and aggregation was induced by a priming dose of collagen (0.25 µg/mL). B, Effect of recombinant mutant sCD40L^{R/Y} and sCD40L^{WT} on whole blood platelet aggregation. Blood was preincubated with 5 µg/mL of sCD40L^{R/Y} or sCD40L^{WT} for 30 minutes at 37°C and aggregation was induced by a priming dose of collagen (0.25 µg/mL). C, Histogram represents the mean of data of whole blood platelet aggregation in response to sCD40L (0.1-5 µg/mL), sCD40L^{WT} (5 µg/mL) and sCD40L^{R/Y} in the presence of a 0.25 µg/mL collagen (control; collagen alone) (n=4; **P*< 0.05 vs. control). D, Impact of sCD40L on PFA-100 closure times. Sodium citrate anticoagulated blood was left untreated (control) or preincubated with sCD40L (5 µg/mL) or sCD40L^{R/Y} (5 µg/mL) for 30 minutes at 37°C and closure times were measured in the presence of collagen/epinephrine cartridges, according to the manufacturer's instructions (n=4; **P*< 0.05 vs. control).

Figure 2. sCD40L enhances platelet adhesion to collagen under flow.

A, Representative fluorescent photomicrographs of platelet adhesion in whole blood on collagen-coated surfaces in the presence of sCD40L. Whole blood was left untreated (control) or preincubated with sCD40L (5 µg/mL) or sCD40L^{R/Y} (5 µg/mL) for 30 minutes at 37°C. Samples were then perfused simultaneously in glass capillaries coated with a priming concentration of collagen (100 µg/mL) at a shear rate of 300s⁻¹. Image acquisition was performed using a digital Camera (Scion Corp.) connected to a Nikon Diaphot 200 epifluorescence microscope (Plan 10x 0.25). The percentage of platelet-covered surface was then quantified by morphometric analysis using the ImageJ software (NIH). B, Histogram represents the mean data of platelet adhesion presented as the percentage of capillary surface covered with platelets (n=3; **P*< 0.05 vs. control).

Figure 3. sCD40L exacerbates thrombus formation *in vivo*.

Impact of enhanced levels of circulating sCD40L on thrombus formation in mice. A, WT and CD40^{-/-} mice were infused with sCD40L (0.25 mg/kg) or vehicle (control) prior to FeCl₃-induced injury of the right carotid artery and thrombus formation was monitored by residual blood flow measurements. Traces are

representative of 6 mice/group ($*P < 0.05$ vs. control). B, Mean of data of the time (in seconds) required to achieve 20%, 40% and 80% occlusion for all 4 groups ($n=6$; $*P < 0.05$ vs. WT). WT, CD40^{-/-} and CD40^{-/-} + sCD40L groups did not achieve 40% and 80% occlusion of the arteries (> 900 seconds).

Figure 4. Representative histological transverse sections of FeCl₃-injured mouse carotid arteries. Following thrombosis measurements, arteries were excised, fixed in 10% buffered formalin, stained with hematoxylin & eosin (A) or verhoeff (B) and visualized using an Olympus BX60 microscope (optical magnification, 20X). Images were captured with a Retiga 2000R camera and visualized through the Image Pro Plus 6.2 software. Sections shown are representative of 6 independent experiments.

Figure 5. sCD40L enhances leukocyte infiltration within the thrombus mass. A, Representative histological transverse sections of FeCl₃-injured mouse carotid arteries immunostained with an anti-CD45 antibody (magnification 40X). Positive cells were mainly detectable in sCD40L-treated WT mice (arrows), indicative of leukocyte incorporation within the thrombus mass. B, Histogram shows quantitative measurements of leukocytes/thrombus section ($n=6$, $*P < 0.05$ vs. WT).

Figure 1

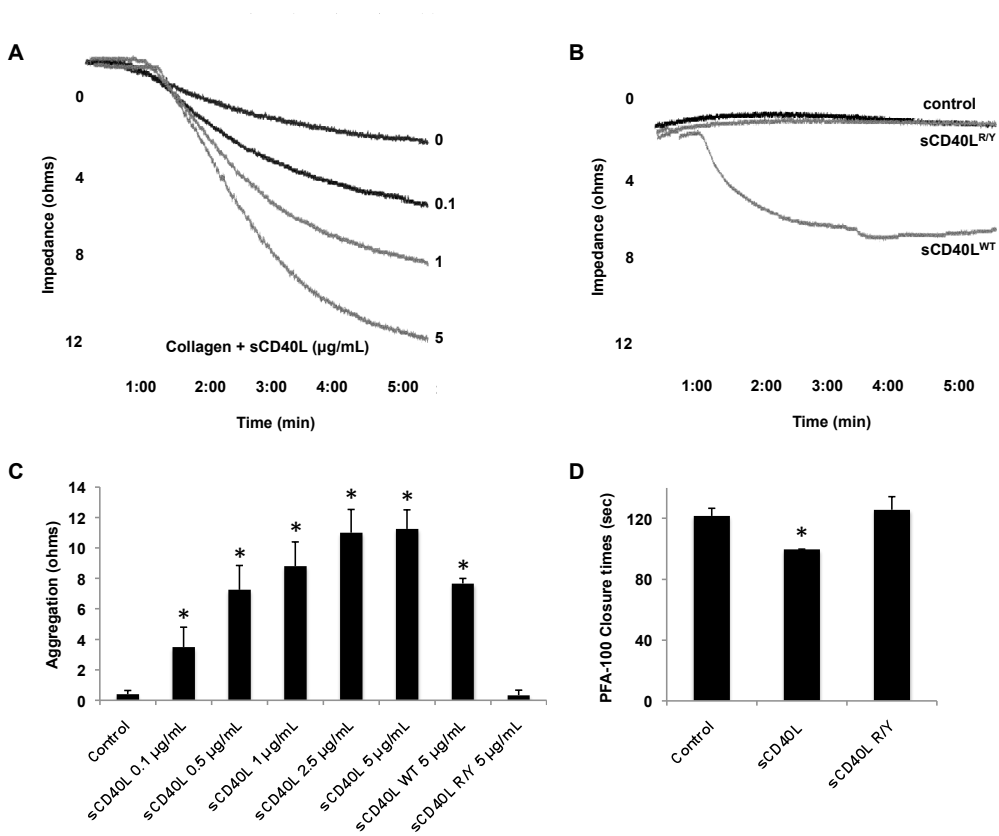


Figure 2

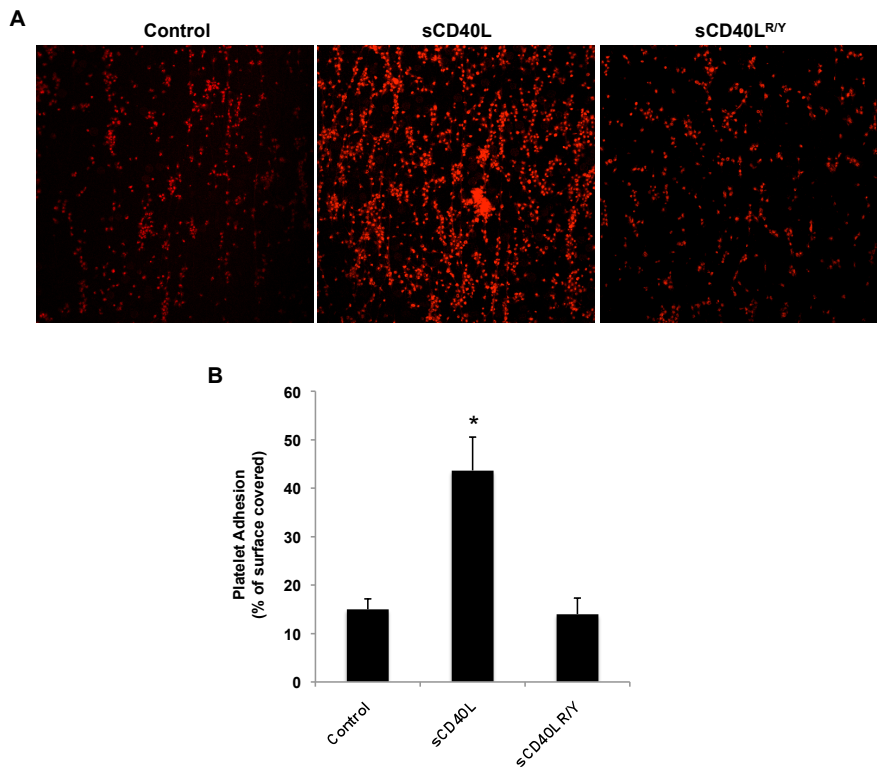


Figure 3

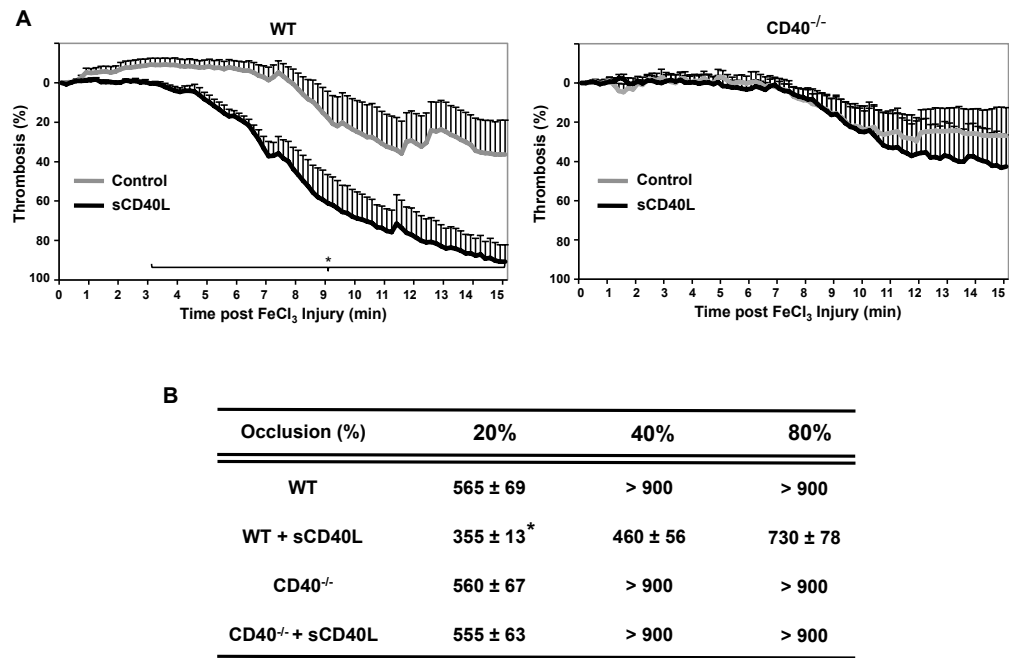


Figure 4

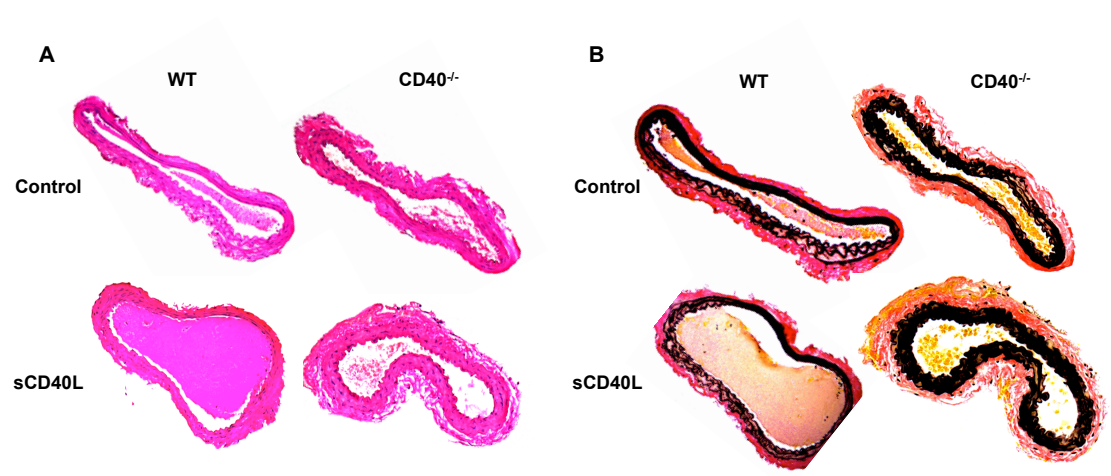
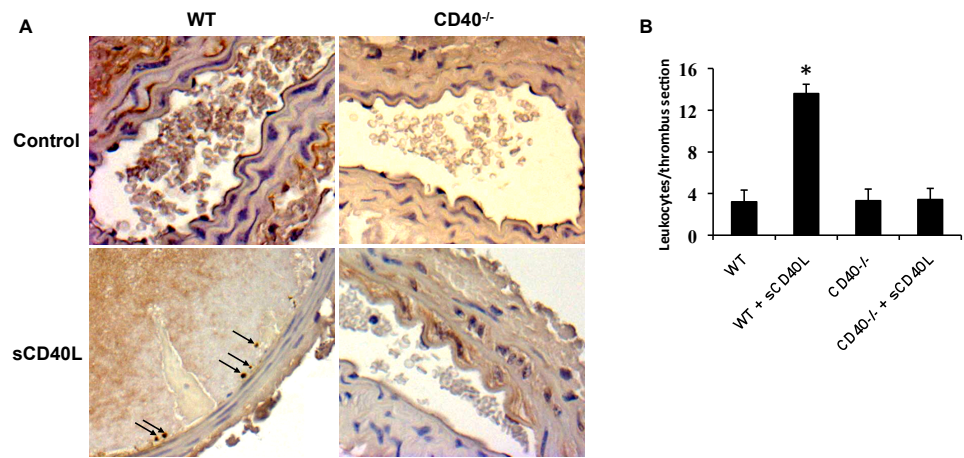


Figure 5



Discussion

Le complexe CD40/CD40L fut, pour longtemps, considéré comme un régulateur crucial de l'immunité acquise. Aujourd'hui, suite à la découverte de l'expression quasi ubiquitaire de cet axe au niveau des cellules du système vasculaire, nous savons que le complexe CD40/CD40L occupe une place centrale dans une variété de réactions inflammatoires. En effet, sa contribution dans toutes les facettes de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique, ainsi que la relation étroite qui existe entre le sCD40L et l'incidence des ACS, soutiennent fortement l'implication de cet axe en tant que joueur prédéterminant de l'inflammation, outre son implication critique dans la production d'immunoglobulines lors de la réponse immunitaire. Conséquemment, certaines études ont tenté de déterminer l'impact du sCD40L sur la fonction des plaquettes, de par leur importance cruciale dans le développement et la progression des maladies cardiovasculaires. Néanmoins, l'effet exact du sCD40L sur la fonction plaquettaire *in vitro* et la thrombose vasculaire *in vivo*, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents, demeuraient largement inexplorés, d'où l'objectif de ce projet.

Les principaux résultats de ces études révèlent que le sCD40L augmente l'activation et l'agrégation plaquettaire par l'entremise d'une voie signalétique TRAF-2/Rac1/p38 MAPK CD40-dépendante. Par ailleurs, nous démontrons en plus que l'augmentation des niveaux circulants du sCD40L exacerbe l'agrégation plaquettaire en sang complet, les temps de thrombose *in vitro* mesurés à l'aide du système PFA-100, l'adhésion plaquettaire au collagène sous flux, la formation du thrombus *in vivo* et l'infiltration leucocytaires au sein de la masse du thrombus, le tout par l'entremise du CD40.

L'agrégation est la fonction principale des plaquettes et nous avons donc évalué dans un premier temps l'impact du sCD40L sur cet aspect important de la physiologie plaquettaire. Le sCD40L n'est pas en mesure de déclencher l'agrégation plaquettaire à lui seul, ni d'induire l'activation de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, comme le font les agonistes plaquettaires puissants, tels que le collagène et la thrombine. Cette observation s'explique fort probablement par le fait que le sCD40L n'induit pas la relâche du calcium intracellulaire ni la sécrétion des granules denses, deux éléments essentiels à l'activation des intégrines et à l'agrégation plaquettaire. Par contre, nous avons découvert que le sCD40L accentue fortement l'agrégation plaquettaire en présence de faibles doses d'agonistes et déclenche la translocation de la P-sélectine à la surface membranaire des plaquettes au repos. Ceci suggère que le sCD40L agit plutôt comme agent déclencheur ('*primer*') qui prédispose les plaquettes à une réponse cellulaire exagérée en réponse à

quelconque agoniste subséquent. En plus du sCD40L, il existe d'autres molécules 'stimulatrices' de la fonction plaquettaire, telles que la MMP-2, Gas-6 et le SDF-1 α .⁴⁷⁸⁻⁴⁸⁰ Comme pour le sCD40L, ces molécules amplifient la réaction plaquettaire sans toutefois occuper une fonction de premier plan au niveau de l'hémostase primaire. Par contre, il est intéressant de noter que ces molécules occupent plutôt un rôle important en conditions pathologiques, ce qui fait d'elles des candidates de premier choix dans le traitement des complications thrombo-inflammatoires.⁴⁸¹ De plus, ce phénomène de déclenchement ('*primer*') cellulaire semble consistant au niveau des différentes cellules qui expriment le CD40/CD40L, puisque la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B requiert la présence de l'IL-4, en plus du CD40L.^{33, 34} Bref, ces éléments suggèrent que le CD40L agit comme élément accessoire important à la fonction plaquettaire.

Il existe à ce jour un élément de controverse quant au récepteur cible du CD40L à la surface des plaquettes. Les résultats de notre étude démontrent clairement, tant par approche moléculaire que génétique, que le CD40 constitue le récepteur principal par lequel le CD40L amplifie la fonction plaquettaire. Ces données sont en accord avec quelques études précédentes qui démontrent que le CD40L favorise l'activation plaquettaire et la relâche de la cytokine RANTES et la génération de radicaux libres par l'entremise du CD40,^{63, 64, 473} son récepteur constitutivement présent à la surface des plaquettes. Toutefois, il fut aussi démontré que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est en mesure d'interagir avec le CD40L.^{28, 29} Par contre, ceci s'effectue en présence de 40 $\mu\text{g/mL}$ de sCD40L sur les plaquettes préalablement activées (l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ainsi dans sa conformation active), ce qui représente une concentration 40 fois supérieure à celle employée dans nos études. Ceci suggère possiblement que le CD40 et l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ constituent les récepteurs de haute et faible affinité pour le sCD40L, respectivement. D'autres études à ce sujet seront toutefois nécessaires afin de faire la lumière sur ce point. Pour l'instant, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation des niveaux plasmatiques du sCD40L, tel qu'observée chez les patients coronariens, stimule les plaquettes via le CD40 (l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ n'étant pas dans sa conformation active au niveau des plaquettes quiescentes en circulation), tandis que les niveaux de sCD40L générés au sein du thrombus suite à l'activation des plaquettes stabilisent l'agrégation plaquettaire par l'entremise de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ceci n'exclue toutefois pas la possibilité que le CD40 participe aussi à la fonction plaquettaire au sein du thrombus. Le CD40L membranaire, généré rapidement suite à l'activation plaquettaire, pourrait certes interagir

avec le CD40 d'une autre plaquette, ce qui faciliterait le changement de forme plaquettaire et son adhésion à la matrice, telle que démontré dans nos études.

Dans les cellules lymphocytaires, la signalisation intracellulaire induite par le CD40 débute par l'association des TRAFs à la queue cytoplasmique du récepteur. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir évalué l'expression des membres des TRAFs dans les plaquettes et leur association au CD40 suite à la stimulation par le CD40L. Puisque seulement TRAF-2 s'associe avec le CD40 en réponse au sCD40L, il s'avère fort probable que ce membre soit ultimement responsable des événements signalétiques déclenchés en aval dans les plaquettes. Étant donné que les plaquettes contiennent aussi le TRAF-1 et le TRAF-6, ces derniers pourraient d'un autre côté jouer un rôle dans la signalisation induite par le récepteur TNF. Même si le CD40 possède un domaine de liaison pour le TRAF-2 et pour le TRAF-6, la liaison d'un ou l'autre semble suffisant afin d'induire l'activation de la NF- κ B dans les cellules B.⁹⁶ Ceci s'avère aussi le cas pour les plaquettes, puisque seule la liaison de TRAF-2 semble être suffisante afin de déclencher une signalisation intracellulaire. Par ailleurs, il fut démontré que le TRAF-3 régule négativement la signalisation induite par le CD40 et occupe un rôle dans l'activation de la protéine LMP-1,^{109, 482} ce qui explique probablement sa faible expression dans les plaquettes.

À la recherche des mécanismes moléculaires sous-jacents impliqués dans les effets pro-agrégants du sCD40L, nous avons initialement posé l'hypothèse que le sCD40L induit la relâche de cytokines inflammatoires plaquettaires responsables de l'augmentation de l'agrégation plaquettaire en réponse à de faibles doses d'agonistes. Étant donné que la MMP-2 et le SDF-1 α ont été identifiés comme molécules stimulatrices capables d'amplifier la fonction plaquettaire,^{479, 480} nous avons mesuré par ELISA la relâche de ces cytokines suite à la stimulation des plaquettes au repos par le sCD40L. Étant donné que nous n'avons détecté aucune sécrétion significative de ces cytokines en réponse au sCD40L (données non publiées), ces molécules ne peuvent expliquer les effets du sCD40L sur la fonction des plaquettes. Les observations sur la morphologie plaquettaire obtenues par microscopie électronique à balayage révèlent que le sCD40L agit directement sur les plaquettes par l'entremise d'un signal cellulaire qui déclenche le changement de forme et la formation de filopodes et lamellipodes membranaires.

Au niveau des plaquettes, les protéines Rac1 et VASP régulent le changement de forme, le réarrangement du cytosquelette et l'étalement cellulaire, principalement par l'entremise de la formation des lamellipodes et filopodes membranaires, respectivement. VASP est typiquement

phosphorylée sur deux principaux résidus, la Ser²³⁹ et la Ser¹⁵⁷. Les inhibiteurs plaquettaires, tels que la prostacycline et le NO, favorisent la phosphorylation des deux résidus, ce qui inhibe la polymérisation de l'actine et le réarrangement du cytosquelette.^{483, 484} Au contraire, les agonistes de l'activation plaquettaire, tels que la thrombine et le collagène, déclenchent seulement la phosphorylation du résidu Ser¹⁵⁷, ce qui favorise la polymérisation de l'actine et le changement de forme plaquettaire.⁴⁸³⁻⁴⁸⁵ La démonstration que le sCD40L induit la phosphorylation de VASP sur le résidu Ser¹⁵⁷ démontre l'importance du sCD40L comme régulateur du changement de forme dans les plaquettes. Cette constatation est en plus soutenue par le fait que le sCD40L déclenche aussi l'activation de la petite GTPase Rac1, une protéine essentielle à la formation des lamellipodes dans les plaquettes. Afin de confirmer la contribution de Rac1 dans la signalisation induite par le CD40, nous avons démontré que l'inhibition spécifique de cette protéine renverse significativement les effets amplificateurs du sCD40L sur l'activation et l'agrégation plaquettaire. Puisque l'inhibition de Rac1 ne fut en mesure de complètement renverser ces effets, il est probable que VASP soit responsable des effets résiduels toujours observés en présence du blocage de Rac1. Plus d'études à ce sujet seront nécessaires afin de clarifier cette hypothèse. Conformément avec nos études, il fut récemment démontré que la stimulation du CD40 dans les cellules endothéliales et dans la lignée lymphocytaire B WEHI favorise la génération de radicaux libres par l'entremise de Rac1.^{486, 487}

Dans les cellules immunitaires, l'activation des MAPKs, telle que la p38, constitue une voie signalétique fondamentale en réponse au sCD40L.⁸⁴ Tel semble être aussi le cas au niveau des plaquettes, étant donné que le sCD40L induit l'activation de la p38 et que son inhibition prévient entièrement les effets pro-agrégants et pro-activateurs du sCD40L. La p38 s'avère donc un effecteur important de Rac1, puisque l'inhibition de cette dernière empêche son activation induite par le sCD40L. Le rôle de la p38 dans les plaquettes n'est pas clairement défini. Cependant, plusieurs études ont démontré que cette protéine favorise l'activation de la COX-1 et la relâche de TxA₂ par les plaquettes.⁴⁸⁸ Cependant, nous n'avons pas observé de relâche de TxA₂ par les plaquettes en réponse au sCD40L (données non publiées), ce qui suggère que le sCD40L n'influence pas l'activation de la COX-1 et que la p38 agit sur une voie alternative. À la lumière de ces résultats, les patients sous thérapie avec l'aspirine ne seraient aucunement protégés contre les effets du sCD40L sur la fonction plaquettaire, étant donné que la COX-1 ne participe pas à la signalisation induite par le CD40. Par contre, il fut aussi démontré que la p38 régule positivement

la polymérisation de l'actine et l'étalement plaquettaire,⁴⁸⁹ ce qui est conforme avec son rôle en tant que régulateur du changement de forme en réponse au sCD40L.

Ayant démontré l'importance du CD40 en réponse au sCD40L, nous avons évalué l'implication du récepteur CD40 dans l'agrégation plaquettaire et le changement de forme en réponse à un agoniste plaquettaire important, tel que le collagène. Suite à l'activation des plaquettes par certains agonistes puissants (thrombine et collagène), le CD40L est rapidement redistribué du cytosol à la membrane plasmique et la forme membranaire de la protéine serait donc en mesure d'interagir avec le CD40 d'une autre plaquette lors de l'agrégation plaquettaire. Cette interaction pourrait ainsi induire un signal de soutien favorisant l'activation des plaquettes. Étant donné que le sCD40L induit un changement de forme plaquettaire, nous n'étions pas surpris d'apprendre que la déficience du CD40, tel que manifesté par les plaquettes de souris CD40^{-/-}, engendre un défaut significatif du changement de forme et de l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène. Dans un premier temps, ces résultats confirment la contribution du sCD40L en tant que régulateur du changement de forme et, dans un deuxième temps, ils mettent en évidence le rôle physiologique de l'axe CD40/CD40L dans l'agrégation plaquettaire, la fonction de base des plaquettes. Le collagène déclenche l'activation plaquettaire par l'entremise de deux principaux récepteurs, la GPIa/IIa et la GPVI. Récemment, il fut démontré que le cytosquelette plaquettaire est essentiel à l'agrégation plaquettaire induite par la GPIa/IIa, et non par la GPVI.⁴⁹⁰ Ceci suggère que le complexe CD40/CD40L et la GPIa/IIa, tous deux impliqués dans le réarrangement du cytosquelette et le changement de forme, collaborent ensemble afin de favoriser l'activation et l'agrégation plaquettaire.

L'agrégation plaquettaire en sang complet représente une approche pratique et physiologique afin d'étudier la fonction plaquettaire, étant donné la présence des leucocytes et facteurs de coagulation, tous impliqués dans la formation du thrombus.⁴⁹¹ Comme pour l'agrégation plaquettaire en cellules isolées, le sCD40L amplifie significativement l'agrégation des plaquettes en sang complet, ce qui indique qu'il est en mesure d'influencer la fonction plaquettaire même dans un contexte physiologique. L'impact du sCD40L sur la fonction des plaquettes en sang complet fut aussi confirmé à l'aide du système PFA-100 qui reflète une mesure des trois phases de l'hémostase primaire, soit l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire.⁴⁹²

L'adhésion plaquettaire est la première étape de l'hémostase et constitue un élément essentiel de la formation du thrombus.⁴⁹³ Suite à l'exposition des composantes de la matrice sous-endothéliale, tel que le collagène, les plaquettes changent rapidement de forme et développent des extensions membranaires nommées filopodes et lamellipodes, ce qui facilite leur adhésion et leur étalement.⁴⁹⁴ Étant donné que le sCD40L induit un changement de forme important au niveau des plaquettes au repos, nous avons par la suite évalué son impact sur l'adhésion plaquettaire au collagène dans un système de perfusion *ex-vivo*. Grâce à l'importance du changement de forme dans le processus de l'adhésion plaquettaire, il n'était pas surprenant d'apprendre que la pre-incubation du sang complet avec le sCD40L amplifie significativement l'étalement et la déposition des plaquettes au collagène, ce qui suggère que les plaquettes étaient préalablement dans une conformation morphologique avancée, comparativement aux plaquettes non traitées. L'adhésion plaquettaire et la formation du thrombus sont intimement liées et ces résultats peuvent en partie expliquer la susceptibilité des souris à former une thrombose exagérée en présence de niveaux élevés de sCD40L circulant. Une prédisposition à l'activation plaquettaire, à l'adhésion et à la formation du thrombus représente un élément clé qui pourrait justifier la relation étroite qui existe entre les niveaux circulant du sCD40L et l'incidence des ACS.

À ce jour, il n'est toujours pas clair si l'augmentation des niveaux circulant du sCD40L chez les patients coronariens reflète la conséquence d'une augmentation prématurée de l'activation plaquettaire ou si cette augmentation est la cause du développement de ces syndromes (ou même une combinaison des deux). Nos études démontrent pour la première fois une corrélation directe entre l'augmentation des niveaux plasmatiques du sCD40L et la thrombose vasculaire. En effet, les souris infusées avec le sCD40L préalablement au dommage vasculaire développèrent des thrombus plus larges que les souris témoins, ce qui indique que ces animaux étaient prédisposés à une réaction thrombotique supérieure. Nos résultats ajoutent une perspective importante à une étude antécédente démontrant que les souris CD40L^{-/-} développent des thrombus instables et que cette déficience peut être corrigée par l'infusion de 1.6 mg/kg de sCD40L, par l'entremise de son interaction avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$.²⁸ Dans nos études, une approche expérimentale différente fut employée, vu que nous voulions mimer des conditions similaires à celles observées chez les patients coronariens. Dans ces conditions, l'augmentation des niveaux circulant du sCD40L à environ 50 ng/mL exacerbe la formation du thrombus par l'entremise du CD40 et non de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Tel que mentionné auparavant, le sCD40L

retrouvé en circulation ‘stimule’ probablement les plaquettes quiescentes préférablement via le CD40, son récepteur constitutivement associé au niveau de la membrane, étant donné que l’intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est dans sa conformation inactive. Dans cette optique, l’interaction du sCD40L avec le CD40 serait impliquée dans la ‘stimulation’ des plaquettes chez les patients coronariens, tandis que son interaction avec l’intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ serait plutôt impliquée dans la stabilité du thrombus aux sites locaux, où le sCD40L est généré suite à l’activation plaquettaire.

L’infusion de 0.25 mg/kg de sCD40L chez la souris résulte en des concentrations plasmatiques d’environ 50 ng/mL de la molécule, probablement suite à la clairance d’une portion significativement par le foie et autres organes métaboliques aux cours des quelques minutes qui suivent l’injection. Il est intéressant de noter que ces concentrations semblent pertinentes d’un point de vue physiopathologique, puisque plusieurs études cliniques ont noté la présence de concentrations plasmatiques de sCD40L s’élevant jusqu’à effectivement 50 ng/mL dans les maladies artérielles périphériques et coronaires.²⁸⁹ Bien évidemment, plus les concentrations circulantes de la molécule augmentent, plus ses effets sur la fonction plaquettaire deviennent importants, et plus les risques de complications vasculaires augmentent. En effet, nous avons démontré un effet dose dépendant du sCD40L sur l’agrégation plaquettaire *in vitro*, où des concentrations aussi faibles que 100 ng/mL et même 10 ng/mL (données non publiées) étaient en mesure d’amplifier la fonction plaquettaire. Les niveaux circulants du sCD40L chez l’humain peuvent être affectés par certains facteurs de risques cardiovasculaires importants. Par exemple, il fut rapporté que le diabète, le syndrome métabolique, l’obésité, la résistance à l’insuline, le sexe, l’hypertension et le tabagisme sont tous des éléments qui ont la capacité d’augmenter les niveaux plasmatiques du sCD40L.^{495, 496} D’un autre côté, certaines modifications thérapeutiques au niveau du style de vie peuvent réduire les niveaux élevés du sCD40L chez les patients diabétiques.⁴⁹⁷ Cependant, il n’est toujours pas clair si l’augmentation du sCD40L circulant en réponse à ces facteurs de risques résulte d’un impact direct de la condition en question ou provient plutôt d’une conséquence indirecte d’une augmentation générale de l’activation des plaquettes en circulation.

Malgré que les plaquettes de souris CD40^{-/-} démontrent un défaut d’agrégation en réponse à de faibles doses de collagène, nous n’avons observé aucune différence significative entre les souris CD40^{-/-} et WT dans la formation du thrombus, ce qui suggère que le CD40 constitue une molécule accessoire et non essentielle à l’hémostase. Au cours de la thrombose *in vivo*, plusieurs éléments participent à la formation du caillot plaquettaire, tels que la thrombine, le collagène, le

facteur vWF, le fibrinogène, les facteurs de coagulation, etc. Ainsi, la déficience en une protéine est souvent contrebalancée par les autres facteurs présents et aucun défaut d'hémostase n'est observé, sauf si la protéine en question occupe une place centrale dans la formation du thrombus, telle que l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Par contre, il est intéressant de noter que même si le CD40 n'est pas essentiel à l'hémostase physiologique, son importance augmente significativement en conditions pathologiques, lorsque les niveaux circulants de sCD40L s'élèvent. Cette constatation fait du CD40 une cible de choix dans le traitement des maladies cardiovasculaires, de par son rôle accentué lors des complications thrombo-inflammatoires.

La formation d'agrégats plaquettes/leucocytes est une manifestation clinique importante, puisqu'elle est souvent témoinnée chez les patients coronariens.^{498, 499} Les interactions entre ces deux cellules sont largement dépendantes de la P-sélectine plaquettaire. Puisque le sCD40L est en mesure d'induire l'expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes au repos,⁵⁰⁰ et étant donné l'importance des complexes plaquettes/leucocytes dans la stabilisation du thrombus, nous avons évalué le degré d'infiltration leucocytaire au sein de la masse thrombotique. Il fut préalablement démontré que le sCD40L induit la formation d'agrégats plaquettes/leucocytes.⁴⁷³ Cependant, nous sommes les premiers à affirmer cet aspect *in vivo*, tout en soulignant l'importance du CD40 dans ce processus. La présence de leucocytes accrue au sein de la masse thrombotique, en plus de la prédisposition des plaquettes à l'activation et l'agrégation, constituent tous deux des éléments qui sont en mesure d'expliquer l'exacerbation thrombotique chez ces animaux.

La contribution relative de la forme soluble versus la forme membranaire du CD40L dans la formation du thrombus demeure inconnue. Il s'avère probable que les deux formes soient impliquées dans l'hémostase primaire. La forme membranaire pourrait interagir avec le CD40 et favoriser l'activation plaquettaire et le changement de forme, tel que démontré dans nos expériences *in vitro* sur les plaquettes de souris CD40^{-/-}, tandis que la forme soluble, générée suite à l'activation plaquettaire, pourrait stabiliser l'agrégation plaquettaire par l'entremise de l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$. Cependant, en conditions pathologiques, lorsque les niveaux circulants du sCD40L augmentent, la forme soluble pourrait ainsi occuper un rôle encore plus prédéterminant, de par ses effets exacerbant sur la formation du thrombus. Bref, plus d'études à ce sujet seront nécessaires afin de clarifier cette problématique.

À la lumière de nos résultats, et en conjonction avec les autres études démontrant l'importance du CD40L dans l'athérosclérose, le CD40L pourrait constituer une cible thérapeutique importante dans les traitements des complications thrombo-inflammatoires. Cependant, il serait d'autant plus pertinent d'établir une corrélation clinique entre le sCD40L et la fonction plaquettaire chez l'humain. Pour ce faire, des études futures devraient évaluer le degré d'activation des plaquettes circulantes directement chez les patients coronariens, par la mesure d'événements cellulaires spécifiquement induits par le sCD40L. À titre d'exemple, il serait fort intéressant d'évaluer le degré d'association de la protéine TRAF-2 dans les plaquettes circulantes de ces patients, de par la présence des hauts niveaux circulants du sCD40L. Ceci pourrait confirmer de manière encore plus convaincante l'association entre les niveaux circulants du sCD40L chez l'humain et la fonction plaquettaire.

En résumé, nos études démontrent pour la première fois l'impact physiopathologique du sCD40L sur les différents aspects de la fonction plaquettaire, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Dans un premier temps, nous démontrons que le sCD40L amplifie l'activation et l'agrégation plaquettaire, par l'entremise d'une voie signalétique TRAF-2/Rac1/p38 MAPK CD40-dépendante. Dans un deuxième temps, nous soulignons l'impact du sCD40L sur la fonction plaquettaire dans un contexte physiologique, soit sur l'agrégation plaquettaire en sang complet, les temps de thrombose *in vitro* mesurés à l'aide du système PFA-100, l'adhésion plaquettaire au collagène en condition de flux et la formation du thrombus *in vivo*. Ces études indiquent que le sCD40L constitue une molécule thrombo-inflammatoire importante, de par sa capacité à prédisposer les plaquettes à l'activation, l'adhésion et la formation du thrombus. L'axe CD40/CD40L pourrait donc constituer une cible pharmacologique importante dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

Conclusions et directions futures

Les résultats de ces études révèlent un nouveau rôle pour le sCD40L dans la régulation de la fonction plaquettaire et la formation du thrombus. En effet, l'impact exact du sCD40L sur les différents aspects de la fonction des plaquettes, telles que l'activation, l'adhésion, l'agrégation et la thrombose, ainsi que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents étaient largement inexplorés. Le résultat le plus pertinent de ces études provient de la corrélation établie entre les niveaux circulants du sCD40L et la thrombose vasculaire *in vivo*. Cette démonstration permet possiblement d'expliquer le lien qui existe entre les niveaux plasmatiques du sCD40L et l'incidence des ACS. Par ailleurs, l'élucidation des mécanismes intracellulaires par lesquels le sCD40L amplifie la fonction plaquettaire apporte une spécificité importante qui pourra servir dans le développement d'une cible thérapeutique précise dans le traitement des maladies vasculaires.

Cependant, plusieurs questions spécifiques soulevées dans nos études méritent d'être explorées. Par exemple, quel est le rôle exact des TRAFs, en particulier TRAF-2, dans la fonction plaquettaire en réponse à d'autres agonistes importants, tels que la thrombine et le collagène? Quelle est la contribution relative des récepteurs CD40 et $\alpha_{IIb}\beta_3$ dans la fonction plaquettaire en réponse au CD40L (ou sCD40L)? Quelles sont les autres protéines signalétiques induites par le CD40 au niveau des plaquettes? Quelle est la contribution relative du sCD40L versus les autres marqueurs cliniques importants, tel que le CRP, dans le développement des complications cardiovasculaires? Quelles sont les concentrations plasmatiques minimales de sCD40L requises afin d'induire des effets significatifs sur la thrombose vasculaire chez les patients coronariens? Les réponses à ces questions apporteront sans doute une contribution importante à nos connaissances sur le rôle exact de l'axe CD40/CD40L dans le développement des maladies cardiovasculaires.

Comme pour toute autre cible pharmacologique, le développement d'un antagoniste spécifique contre le complexe CD40/CD40L engendre certains problèmes importants. De par l'importance cruciale de l'axe CD40/CD40L dans l'immunité, l'inhibition d'une de ses composantes résulterait en l'apparition d'effets secondaires indésirables, particulièrement en relation avec les défauts de production d'anticorps qui seraient présents chez les patients traités. À cet égard, il s'avère absolument crucial de mieux définir les mécanismes par lesquels ce complexe affecte la fonction plaquettaire afin de cibler un élément spécifiquement impliqué dans la maladie en question. Par exemple, il serait préférable de réduire les niveaux circulants du

sCD40L en bloquant particulièrement son clivage enzymatique au niveau de la membrane plaquettaire. Alternativement, le blocage de protéines signalétiques plaquettaires, tel que TRAF-2, pourrait représenter une meilleure approche, étant donné que TRAF-6 serait en mesure de plus ou moins contrebalancer la perte de TRAF-2 dans les cellules immunitaires et d'induire la production d'immunoglobulines par les lymphocytes B. Finalement, la meilleure approche serait de bloquer la protéine (CD40, ou autres) uniquement au niveau des plaquettes, à l'aide de vecteurs ou nanoparticules spécifiques à ces cellules.

Pour conclure, l'axe CD40/CD40L représente une cible thérapeutique potentiel dans le traitement des syndromes cardiovasculaire, tels que les ACS. Plus d'études seront cependant nécessaires afin de mieux définir son rôle et ses partenaires moléculaires dans le développement de ces syndromes. Ces études supportent une fois de plus l'implication étroite de l'inflammation et de ces composantes dans la pathogénèse de la maladie.

Bibliographie

1. Clark EA, Ledbetter JA. Activation of human b cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, bp35 and bp50. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:4494-4498
2. Paulie S, Ehlin-Henriksson B, Mellstedt H, Koho H, Ben-Aissa H, Perlmann P. A p50 surface antigen restricted to human urinary bladder carcinomas and b lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 1985;20:23-28
3. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. Cd40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594
4. Schonbeck U, Libby P. The cd40/cd154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:4-43
5. Lievens D, Eijgelaar WJ, Biessen EA, Daemen MJ, Lutgens E. The multi-functionality of cd40l and its receptor cd40 in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2009;102:206-214
6. Karmann K, Hughes CC, Schechner J, Fanslow WC, Poher JS. Cd40 on human endothelial cells: Inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:4342-4346
7. Mach F, Schonbeck U, Fabunmi RP, Murphy C, Atkinson E, Bonnefoy JY, Graber P, Libby P. T lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by a cd40l-dependent mechanism: Implications for tubule formation. *Am J Pathol*. 1999;154:229-238
8. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Herman M, Graber P, Kehry MR, Libby P. Cd40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am J Pathol*. 2000;156:7-14
9. Peters AL, Stunz LL, Bishop GA. Cd40 and autoimmunity: The dark side of a great activator. *Semin Immunol*. 2009;21:293-300
10. Cipollone F, Chiarelli F, Davi G, Ferri C, Desideri G, Fazia M, Iezzi A, Santilli F, Pini B, Cuccurullo C, Tumini S, Del Ponte A, Santucci A, Cuccurullo F, Mezzetti A. Enhanced soluble cd40 ligand contributes to endothelial cell dysfunction in vitro and monocyte activation in patients with diabetes mellitus: Effect of improved metabolic control. *Diabetologia*. 2005;48:1216-1224
11. Garlachs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG. Upregulation of cd40 and cd40 ligand (cd154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation*. 2001;104:2395-2400
12. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, van den Brand MJ, Boersma E, Zeiher AM, Simoons ML. Soluble cd40 ligand in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2003;348:1104-1111
13. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesaro M, Sorge R, Lauro R, Violi F. Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet cd40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 2005;111:412-419
14. Hill A, Chapel H. X-linked immunodeficiency. The fruits of cooperation. *Nature*. 1993;361:494
15. Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for cd40. *Nature*. 1992;357:80-82
16. Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated cd4+ t cells that induces contact-dependent b cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992;175:1091-1101

17. Villa A, Notarangelo LD, Di Santo JP, Macchi PP, Strina D, Frattini A, Lucchini F, Patrosso CM, Giliani S, Mantuano E, et al. Organization of the human cd40l gene: Implications for molecular defects in x chromosome-linked hyper-igm syndrome and prenatal diagnosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:2110-2114
18. Karpusas M, Hsu YM, Wang JH, Thompson J, Lederman S, Chess L, Thomas D. 2 a crystal structure of an extracellular fragment of human cd40 ligand. *Structure*. 1995;3:1031-1039
19. Hsu YM, Lucci J, Su L, Ehrenfels B, Garber E, Thomas D. Heteromultimeric complexes of cd40 ligand are present on the cell surface of human t lymphocytes. *J Biol Chem*. 1997;272:911-915
20. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived cd40l: The switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;106:896-899
21. Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. Cd40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent b-cell activation. *Immunol Today*. 1992;13:431-433
22. Grimaldi JC, Torres R, Kozak CA, Chang R, Clark EA, Howard M, Cockayne DA. Genomic structure and chromosomal mapping of the murine cd40 gene. *J Immunol*. 1992;149:3921-3926
23. Naismith JH, Sprang SR. Modularity in the tnfr-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998;23:74-79
24. Reyes-Moreno C, Girouard J, Lapointe R, Darveau A, Mourad W. Cd40/cd40 homodimers are required for cd40-induced phosphatidylinositol 3-kinase-dependent expression of b7.2 by human b lymphocytes. *J Biol Chem*. 2004;279:7799-7806
25. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in tnfr receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000;288:2351-2354
26. Bajorath J. Detailed comparison of two molecular models of the human cd40 ligand with an x-ray structure and critical assessment of model-based mutagenesis and residue mapping studies. *J Biol Chem*. 1998;273:24603-24609
27. Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ, Spoon TL, Siadak AW, Gordon M, Noelle RJ, Hollenbaugh D, Aruffo A. Analysis of gp39/cd40 interactions using molecular models and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 1995;34:9884-9892
28. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD. Cd40l stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*. 2002;8:247-252
29. Prasad KS, Andre P, He M, Bao M, Manganello J, Phillips DR. Soluble cd40 ligand induces beta3 integrin tyrosine phosphorylation and triggers platelet activation by outside-in signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12367-12371
30. Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, Ley K, Sarembock IJ. Cd40 ligand promotes mac-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol*. 2008;172:1141-1152
31. Leveille C, Bouillon M, Guo W, Bolduc J, Sharif-Askari E, El-Fakhry Y, Reyes-Moreno C, Lapointe R, Merhi Y, Wilkins JA, Mourad W. Cd40 ligand binds to alpha5beta1 integrin and triggers cell signaling. *J Biol Chem*. 2007;282:5143-5151
32. Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, Bajorath J, Grosmaire LS, Stenkamp R, Neubauer M, et al. The cd40 ligand, gp39, is defective in activated t cells from patients with x-linked hyper-igm syndrome. *Cell*. 1993;72:291-300

33. Armitage RJ, Macduff BM, Spriggs MK, Fanslow WC. Human b cell proliferation and ig secretion induced by recombinant cd40 ligand are modulated by soluble cytokines. *J Immunol.* 1993;150:3671-3680
34. Spriggs MK, Armitage RJ, Strockbine L, Clifford KN, Macduff BM, Sato TA, Maliszewski CR, Fanslow WC. Recombinant human cd40 ligand stimulates b cell proliferation and immunoglobulin e secretion. *J Exp Med.* 1992;176:1543-1550
35. Boussiotis VA, Nadler LM, Strominger JL, Goldfeld AE. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth factor for normal human b cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:7007-7011
36. Burdin N, Peronne C, Banchereau J, Rousset F. Epstein-barr virus transformation induces b lymphocytes to produce human interleukin 10. *J Exp Med.* 1993;177:295-304
37. Grewal IS, Flavell RA. Cd40 and cd154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:111-135
38. Barrett TB, Shu G, Clark EA. Cd40 signaling activates cd11a/cd18 (lfa-1)-mediated adhesion in b cells. *J Immunol.* 1991;146:1722-1729
39. Hollenbaugh D, Ochs HD, Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. The role of cd40 and its ligand in the regulation of the immune response. *Immunol Rev.* 1994;138:23-37
40. Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human b lymphocytes triggered through their cd40 antigen. *J Exp Med.* 1991;173:705-710
41. Khanna R, Cooper L, Kienzle N, Moss DJ, Burrows SR, Khanna KK. Engagement of cd40 antigen with soluble cd40 ligand up-regulates peptide transporter expression and restores endogenous processing function in burkitt's lymphoma cells. *J Immunol.* 1997;159:5782-5785
42. Klaus SJ, Berberich I, Shu G, Clark EA. Cd40 and its ligand in the regulation of humoral immunity. *Semin Immunol.* 1994;6:279-286
43. Clodi K, Asgary Z, Zhao S, Kliche KO, Cabanillas F, Andreeff M, Younes A. Coexpression of cd40 and cd40 ligand in b-cell lymphoma cells. *Br J Haematol.* 1998;103:270-275
44. Grammer AC, Bergman MC, Miura Y, Fujita K, Davis LS, Lipsky PE. The cd40 ligand expressed by human b cells costimulates b cell responses. *J Immunol.* 1995;154:4996-5010
45. Gray D, Bergthorsdottir S, van Essen D, Wykes M, Poudrier J, Siepmann K. Observations on memory b-cell development. *Semin Immunol.* 1997;9:249-254
46. Pound JD, Gordon J. Maintenance of human germinal center b cells in vitro. *Blood.* 1997;89:919-928
47. Grewal IS, Xu J, Flavell RA. Impairment of antigen-specific t-cell priming in mice lacking cd40 ligand. *Nature.* 1995;378:617-620
48. Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. Cd40/cd154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:307-328
49. Renshaw BR, Fanslow WC, 3rd, Armitage RJ, Campbell KA, Liggitt D, Wright B, Davison BL, Maliszewski CR. Humoral immune responses in cd40 ligand-deficient mice. *J Exp Med.* 1994;180:1889-1900
50. van Essen D, Kikutani H, Gray D. Cd40 ligand-transduced co-stimulation of t cells in the development of helper function. *Nature.* 1995;378:620-623
51. Matthies KM, Newman JL, Hodzic A, Wingett DG. Differential regulation of soluble and membrane cd40l proteins in t cells. *Cell Immunol.* 2006;241:47-58

52. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for cd40 expression on cd8+ t cells in the generation of cd8+ t cell memory. *Science*. 2002;297:2060-2063
53. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of cd40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances t cell stimulatory capacity: T-t help via apc activation. *J Exp Med*. 1996;184:747-752
54. Alderson MR, Armitage RJ, Tough TW, Strockbine L, Fanslow WC, Spriggs MK. Cd40 expression by human monocytes: Regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for cd40. *J Exp Med*. 1993;178:669-674
55. Kennedy MK, Picha KS, Fanslow WC, Grabstein KH, Alderson MR, Clifford KN, Chin WA, Mohler KM. Cd40/cd40 ligand interactions are required for t cell-dependent production of interleukin-12 by mouse macrophages. *Eur J Immunol*. 1996;26:370-378
56. Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. Stimulation of cd40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J Immunol*. 1995;155:4917-4925
57. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired t cell-mediated macrophage activation in cd40 ligand-deficient mice. *J Immunol*. 1996;156:8-11
58. Wagner DH, Jr., Stout RD, Suttles J. Role of the cd40-cd40 ligand interaction in cd4+ t cell contact-dependent activation of monocyte interleukin-1 synthesis. *Eur J Immunol*. 1994;24:3148-3154
59. Mach F, Schonbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of cd40: Induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. 1997;96:396-399
60. Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. Activation of human monocytes through cd40 induces matrix metalloproteinases. *J Immunol*. 1996;156:3952-3960
61. Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, Patko Z, Aikawa M, Schonbeck U, Bode C, Libby P, Peter K. Cd40 ligand mediates inflammation independently of cd40 by interaction with mac-1. *Circulation*. 2007;115:1571-1580
62. Suttles J, Stout RD. Macrophage cd40 signaling: A pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol*. 2009;21:257-264
63. Chakrabarti S, Varghese S, Vitseva O, Tanriverdi K, Freedman JE. Cd40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2428-2434
64. Danese S, de la Motte C, Reyes BM, Sans M, Levine AD, Fiocchi C. Cutting edge: T cells trigger cd40-dependent platelet activation and granular rantes release: A novel pathway for immune response amplification. *J Immunol*. 2004;172:2011-2015
65. Rizvi M, Pathak D, Freedman JE, Chakrabarti S. Cd40-cd40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease. *Trends Mol Med*. 2008;14:530-538
66. Stout RD, Suttles J. The many roles of cd40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol Today*. 1996;17:487-492
67. Wagner AH, Guldenzoph B, Lienenluke B, Hecker M. Cd154/cd40-mediated expression of cd154 in endothelial cells: Consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:715-720
68. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by cd40 ligand is mediated via

- activator protein 1, nuclear factor kappa b, and egr-1. *J Biol Chem.* 2002;277:25032-25039
69. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, Mukhopadhyay D, Briscoe DM. Ligation of cd40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood.* 2000;96:3801-3808
 70. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1999;155:1281-1291
 71. Hermann A, Schror K, Weber AA. Cd40 ligand (cd40l) does not stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells. *Eur J Cell Biol.* 2002;81:213-221
 72. Mukundan L, Milhorn DM, Matta B, Suttles J. Cd40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through a src-initiated, mapk-dependent pathway. *Cell Signal.* 2004;16:375-384
 73. Horton DB, Libby P, Schonbeck U. Ligation of cd40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:329-336
 74. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:253-258
 75. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through cd40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180:1263-1272
 76. Shepherd DM, Kerkvliet NI. Disruption of cd154: Cd40 blocks generation of allograft immunity without affecting apc activation. *J Immunol.* 1999;163:2470-2477
 77. Iezzi G, Sonderegger I, Ampenberger F, Schmitz N, Marsland BJ, Kopf M. Cd40-cd40l cross-talk integrates strong antigenic signals and microbial stimuli to induce development of il-17-producing cd4+ t cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:876-881
 78. Bergtold A, Desai DD, Gavhane A, Clynes R. Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of b cells. *Immunity.* 2005;23:503-514
 79. Qi H, Egen JG, Huang AY, Germain RN. Extrafollicular activation of lymph node b cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science.* 2006;312:1672-1676
 80. Wykes M, MacPherson G. Dendritic cell-b-cell interaction: Dendritic cells provide b cells with cd40-independent proliferation signals and cd40-dependent survival signals. *Immunology.* 2000;100:1-3
 81. Vanichakarn P, Blair P, Wu C, Freedman JE, Chakrabarti S. Neutrophil cd40 enhances platelet-mediated inflammation. *Thromb Res.* 2008;122:346-358
 82. Bishop GA, Moore CR, Xie P, Stunz LL, Kraus ZJ. Traf proteins in cd40 signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2007;597:131-151
 83. Davies CC, Mak TW, Young LS, Eliopoulos AG. Traf6 is required for traf2-dependent cd40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 2005;25:9806-9819
 84. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of cd40/cd40l engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229:152-172
 85. Saemann MD, Diakos C, Kelemen P, Kriehuber E, Zeyda M, Bohmig GA, Horl WH, Baumruker T, Zlabinger GJ. Prevention of cd40-triggered dendritic cell maturation and induction of t-cell hyporeactivity by targeting of janus kinase 3. *Am J Transplant.* 2003;3:1341-1349

86. Saemann MD, Kelemen P, Zeyda M, Bohmig G, Staffler G, Zlabinger GJ. Cd40 triggered human monocyte-derived dendritic cells convert to tolerogenic dendritic cells when jak3 activity is inhibited. *Transplant Proc.* 2002;34:1407-1408
87. Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (trafs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev.* 1998;12:2821-2830
88. Bishop GA, Hostager BS, Brown KD. Mechanisms of tnfr receptor-associated factor (traf) regulation in b lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2002;72:19-23
89. McWhirter SM, Pullen SS, Holton JM, Crute JJ, Kehry MR, Alber T. Crystallographic analysis of cd40 recognition and signaling by human traf2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:8408-8413
90. Ni CZ, Welsh K, Leo E, Chiou CK, Wu H, Reed JC, Ely KR. Molecular basis for cd40 signaling mediated by traf3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:10395-10399
91. Schwenzer R, Sieminski K, Liptay S, Schubert G, Peters N, Scheurich P, Schmid RM, Wajant H. The human tumor necrosis factor (tnf) receptor-associated factor 1 gene (traf1) is up-regulated by cytokines of the tnfr ligand family and modulates tnfr-induced activation of nf-kappa b and c-jun n-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1999;274:19368-19374
92. Zapata JM, Krajewska M, Krajewski S, Kitada S, Welsh K, Monks A, McCloskey N, Gordon J, Kipps TJ, Gascoyne RD, Shabaik A, Reed JC. Tnfr-associated factor family protein expression in normal tissues and lymphoid malignancies. *J Immunol.* 2000;165:5084-5096
93. Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. Cd40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (traf) interactions: Regulation of cd40 signaling through multiple traf binding sites and traf hetero-oligomerization. *Biochemistry.* 1998;37:11836-11845
94. Arron JR, Pewzner-Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y. Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor-associated factor (traf)2 by traf1 reveals mechanisms of traf2 signaling. *J Exp Med.* 2002;196:923-934
95. Xie P, Hostager BS, Munroe ME, Moore CR, Bishop GA. Cooperation between tnfr receptor-associated factors 1 and 2 in cd40 signaling. *J Immunol.* 2006;176:5388-5400
96. Hostager BS, Haxhinasto SA, Rowland SL, Bishop GA. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (traf2)-deficient b lymphocytes reveal novel roles for traf2 in cd40 signaling. *J Biol Chem.* 2003;278:45382-45390
97. Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. Traf2 is essential for jnk but not nf-kappa b activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity.* 1997;7:703-713
98. Yeh WC, Shahinian A, Speiser D, Kraunus J, Billia F, Wakeham A, de la Pompa JL, Ferrick D, Hum B, Iscove N, Ohashi P, Rothe M, Goeddel DV, Mak TW. Early lethality, functional nf-kappa b activation, and increased sensitivity to tnfr-induced cell death in traf2-deficient mice. *Immunity.* 1997;7:715-725
99. Gallagher E,ENZLER T, Matsuzawa A, Anzelon-Mills A, Otero D, Holzer R, Janssen E, Gao M, Karin M. Kinase mekk1 is required for cd40-dependent activation of the kinases jnk and p38, germinal center formation, b cell proliferation and antibody production. *Nat Immunol.* 2007;8:57-63
100. Hsing Y, Hostager BS, Bishop GA. Characterization of cd40 signaling determinants regulating nuclear factor-kappa b activation in b lymphocytes. *J Immunol.* 1997;159:4898-4906

101. Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV. Traf2-mediated activation of nf-kappa b by tnfr receptor 2 and cd40. *Science*. 1995;269:1424-1427
102. Bishop GA. The multifaceted roles of trafs in the regulation of b-cell function. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:775-786
103. Gardam S, Sierro F, Basten A, Mackay F, Brink R. Traf2 and traf3 signal adapters act cooperatively to control the maturation and survival signals delivered to b cells by the baff receptor. *Immunity*. 2008;28:391-401
104. Vallabhapurapu S, Matsuzawa A, Zhang W, Tseng PH, Keats JJ, Wang H, Vignali DA, Bergsagel PL, Karin M. Nonredundant and complementary functions of traf2 and traf3 in a ubiquitination cascade that activates nik-dependent alternative nf-kappab signaling. *Nat Immunol*. 2008;9:1364-1370
105. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, Shiba T, Yang X, Yeh WC, Mak TW, Korneluk RG, Cheng G. Noncanonical nf-kappab activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors ciap1, ciap2, traf2 and traf3 and the kinase nik. *Nat Immunol*. 2008;9:1371-1378
106. Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, Brink R, Leverkus M, Tergaonkar V, Schneider P, Callus BA, Koentgen F, Vaux DL, Silke J. Iap antagonists target ciap1 to induce tnfa-dependent apoptosis. *Cell*. 2007;131:682-693
107. Brown KD, Hostager BS, Bishop GA. Regulation of traf2 signaling by self-induced degradation. *J Biol Chem*. 2002;277:19433-19438
108. He JQ, Oganessian G, Saha SK, Zarnegar B, Cheng G. Traf3 and its biological function. *Adv Exp Med Biol*. 2007;597:48-59
109. Xie P, Hostager BS, Bishop GA. Requirement for traf3 in signaling by lmp1 but not cd40 in b lymphocytes. *J Exp Med*. 2004;199:661-671
110. Propst SM, Estell K, Schwiebert LM. Cd40-mediated activation of nf-kappa b in airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:37054-37063
111. Urbich C, Mallat Z, Tedgui A, Clauss M, Zeiher AM, Dimmeler S. Upregulation of traf-3 by shear stress blocks cd40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest*. 2001;108:1451-1458
112. Masson R, Regnier CH, Chenard MP, Wendling C, Mattei MG, Tomasetto C, Rio MC. Tumor necrosis factor receptor associated factor 4 (traf4) expression pattern during mouse development. *Mech Dev*. 1998;71:187-191
113. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M. Identification and characterization of an ikappab kinase. *Cell*. 1997;90:373-383
114. Krajewska M, Krajewski S, Zapata JM, Van Arsdale T, Gascoyne RD, Berern K, McFadden D, Shabaik A, Hugh J, Reynolds A, Clevenger CV, Reed JC. Traf-4 expression in epithelial progenitor cells. Analysis in normal adult, fetal, and tumor tissues. *Am J Pathol*. 1998;152:1549-1561
115. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, Engelmann H. Tnf receptor (tnfr)-associated factor (traf) 3 serves as an inhibitor of traf2/5-mediated activation of the noncanonical nf-kappab pathway by traf-binding tnfrs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:2874-2879
116. Nakano H, Sakon S, Koseki H, Takemori T, Tada K, Matsumoto M, Munechika E, Sakai T, Shirasawa T, Akiba H, Kobata T, Santee SM, Ware CF, Rennert PD, Taniguchi M, Yagita H, Okumura K. Targeted disruption of traf5 gene causes defects in cd40- and cd27-mediated lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9803-9808

117. Rowland SL, Tremblay MM, Ellison JM, Stunz LL, Bishop GA, Hostager BS. A novel mechanism for tnfr-associated factor 6-dependent cd40 signaling. *J Immunol.* 2007;179:4645-4653
118. Arron JR, Vologodskaia M, Wong BR, Naramura M, Kim N, Gu H, Choi Y. A positive regulatory role for cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and cd40l-mediated akt activation. *J Biol Chem.* 2001;276:30011-30017
119. Davies CC, Mason J, Wakelam MJ, Young LS, Eliopoulos AG. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase- and erk mapk-regulated protein synthesis reveals the pro-apoptotic properties of cd40 ligation in carcinoma cells. *J Biol Chem.* 2004;279:1010-1019
120. Hanissian SH, Geha RS. Jak3 is associated with cd40 and is critical for cd40 induction of gene expression in b cells. *Immunity.* 1997;6:379-387
121. Revy P, Hivroz C, Andreu G, Graber P, Martinache C, Fischer A, Durandy A. Activation of the janus kinase 3-stat5a pathway after cd40 triggering of human monocytes but not of resting b cells. *J Immunol.* 1999;163:787-793
122. Pine R, Canova A, Schindler C. Tyrosine phosphorylated p91 binds to a single element in the isgf2/irf-1 promoter to mediate induction by ifn alpha and ifn gamma, and is likely to autoregulate the p91 gene. *EMBO J.* 1994;13:158-167
123. Ma DY, Clark EA. The role of cd40 and cd154/cd40l in dendritic cells. *Semin Immunol.* 2009;21:265-272
124. Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, Bedell MA, Edelhoff S, Distech CM, Simoneaux DK, et al. Cd40 ligand gene defects responsible for x-linked hyper-igm syndrome. *Science.* 1993;259:990-993
125. Durandy A, Schiff C, Bonnefoy JY, Forveille M, Rousset F, Mazzei G, Milili M, Fischer A. Induction by anti-cd40 antibody or soluble cd40 ligand and cytokines of iga and ige production by b cells from patients with x-linked hyper igm syndrome. *Eur J Immunol.* 1993;23:2294-2299
126. Fuleihan R, Ramesh N, Loh R, Jabara H, Rosen RS, Chatila T, Fu SM, Stamenkovic I, Geha RS. Defective expression of the cd40 ligand in x chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated igm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:2170-2173
127. Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, Ugazio AG, Notarangelo LD, Levinsky RJ, Kroczeck RA. Defective expression of t-cell cd40 ligand causes x-linked immunodeficiency with hyper-igm. *Nature.* 1993;361:539-541
128. Castigli E, Alt FW, Davidson L, Bottaro A, Mizoguchi E, Bhan AK, Geha RS. Cd40-deficient mice generated by recombination-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:12135-12139
129. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, Tanaka T, Fujiwara H, Suematsu S, Yoshida N, Kishimoto T, Kikutani H. The immune responses in cd40-deficient mice: Impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1:167-178
130. Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. Mice deficient for the cd40 ligand. *Immunity.* 1994;1:423-431
131. Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. Gp39-cd40 interactions are essential for germinal center formation and the development of b cell memory. *J Exp Med.* 1994;180:157-163

132. Foy TM, Shepherd DM, Durie FH, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. In vivo cd40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. Ii. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for cd40, gp39. *J Exp Med*. 1993;178:1567-1575
133. Van den Eertwegh AJ, Noelle RJ, Roy M, Shepherd DM, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. In vivo cd40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. I. In vivo expression of cd40 ligand, cytokines, and antibody production delineates sites of cognate t-b cell interactions. *J Exp Med*. 1993;178:1555-1565
134. Liang H, Russell RS, Yonkers NL, McDonald D, Rodriguez B, Harding CV, Anthony DD. Differential effects of hepatitis c virus jfh1 on human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol*. 2009;83:5693-5707
135. Hellman P, Eriksson H. Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Hum Immunol*. 2007;68:324-333
136. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector th17 and regulatory t cells. *Nature*. 2006;441:235-238
137. Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat Immunol*. 2006;7:1151-1156
138. DeKruyff RH, Rizzo LV, Umetsu DT. Induction of immunoglobulin synthesis by cd4+ t cell clones. *Semin Immunol*. 1993;5:421-430
139. Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, Clark EA. Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human b-cell proliferation requires the tn timer family ligand baff. *Blood*. 2003;101:4464-4471
140. Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. Dcs induce cd40-independent immunoglobulin class switching through blys and april. *Nat Immunol*. 2002;3:822-829
141. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. Baff and april: A tutorial on b cell survival. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:231-264
142. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, Shiohara T, Akira S, Ohteki T. Regulation of iga production by naturally occurring tn timer/inos-producing dendritic cells. *Nature*. 2007;448:929-933
143. Schonbeck U, Libby P. Cd40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 2001;89:1092-1103
144. Banchereau J, de Paoli P, Valle A, Garcia E, Rousset F. Long-term human b cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to cd40. *Science*. 1991;251:70-72
145. Liu YJ, Cairns JA, Holder MJ, Abbot SD, Jansen KU, Bonnefoy JY, Gordon J, MacLennan IC. Recombinant 25-kda cd23 and interleukin 1 alpha promote the survival of germinal center b cells: Evidence for bifurcation in the development of centrocytes rescued from apoptosis. *Eur J Immunol*. 1991;21:1107-1114
146. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature*. 1989;342:929-931
147. Lomo J, Blomhoff HK, Jacobsen SE, Krajewski S, Reed JC, Smeland EB. Interleukin-13 in combination with cd40 ligand potentially inhibits apoptosis in human b lymphocytes: Upregulation of bcl-xl and mcl-1. *Blood*. 1997;89:4415-4424

148. Baker MP, Eliopoulos AG, Young LS, Armitage RJ, Gregory CD, Gordon J. Prolonged phenotypic, functional, and molecular change in group i burkitt lymphoma cells on short-term exposure to cd40 ligand. *Blood*. 1998;92:2830-2843
149. Funakoshi S, Longo DL, Beckwith M, Conley DK, Tsarfaty G, Tsarfaty I, Armitage RJ, Fanslow WC, Spriggs MK, Murphy WJ. Inhibition of human b-cell lymphoma growth by cd40 stimulation. *Blood*. 1994;83:2787-2794
150. Heath AW, Chang R, Harada N, Santos-Argumedo L, Gordon J, Hannum C, Campbell D, Shanafelt AB, Clark EA, Torres R, et al. Antibodies to murine cd40 stimulate normal b lymphocytes but inhibit proliferation of b lymphoma cells. *Cell Immunol*. 1993;152:468-480
151. Henriquez NV, Floettmann E, Salmon M, Rowe M, Rickinson AB. Differential responses to cd40 ligation among burkitt lymphoma lines that are uniformly responsive to epstein-barr virus latent membrane protein 1. *J Immunol*. 1999;162:3298-3307
152. Klaus GG, Choi MS, Lam EW, Johnson-Leger C, Cliff J. Cd40: A pivotal receptor in the determination of life/death decisions in b lymphocytes. *Int Rev Immunol*. 1997;15:5-31
153. Choi MS, Boise LH, Gottschalk AR, Quintans J, Thompson CB, Klaus GG. The role of bcl-xl in cd40-mediated rescue from anti-mu-induced apoptosis in wehi-231 b lymphoma cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:1352-1357
154. Hennino A, Berard M, Krammer PH, Defrance T. Flice-inhibitory protein is a key regulator of germinal center b cell apoptosis. *J Exp Med*. 2001;193:447-458
155. Lee HH, Dadgostar H, Cheng Q, Shu J, Cheng G. Nf-kappaB-mediated up-regulation of bcl-x and bfl-1/a1 is required for cd40 survival signaling in b lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9136-9141
156. Sarma V, Lin Z, Clark L, Rust BM, Tewari M, Noelle RJ, Dixit VM. Activation of the b-cell surface receptor cd40 induces a20, a novel zinc finger protein that inhibits apoptosis. *J Biol Chem*. 1995;270:12343-12346
157. Zhang X, Li L, Choe J, Krajewski S, Reed JC, Thompson C, Choi YS. Up-regulation of bcl-xl expression protects cd40-activated human b cells from fas-mediated apoptosis. *Cell Immunol*. 1996;173:149-154
158. Szocinski JL, Khaled AR, Hixon J, Halverson D, Funakoshi S, Fanslow WC, Boyd A, Taub DD, Durum SK, Siegall CB, Longo DL, Murphy WJ. Activation-induced cell death of aggressive histology lymphomas by cd40 stimulation: Induction of bax. *Blood*. 2002;100:217-223
159. Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, Stone MJ. Growth-inhibitory effects of cd40 ligand (cd154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7:691-703
160. Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J. Fas ligation induces apoptosis of cd40-activated human b lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;182:1265-1273
161. Wierda WG, Cantwell MJ, Woods SJ, Rassenti LZ, Prussak CE, Kipps TJ. Cd40-ligand (cd154) gene therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2000;96:2917-2924
162. Eliopoulos AG, Dawson CW, Mosialos G, Floettmann JE, Rowe M, Armitage RJ, Dawson J, Zapata JM, Kerr DJ, Wakelam MJ, Reed JC, Kieff E, Young LS. Cd40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by epstein-barr virus-encoded lmp1: Involvement of traf3 as a common mediator. *Oncogene*. 1996;13:2243-2254

163. Wingett DG, Vestal RE, Forcier K, Hadjokas N, Nielson CP. Cd40 is functionally expressed on human breast carcinomas: Variable inducibility by cytokines and enhancement of fas-mediated apoptosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1998;50:27-36
164. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of cd40 signalling. *Nature.* 1998;394:200-203
165. Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA. Requirement for cd154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med.* 1999;5:1313-1316
166. Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Kotliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ. Both early and delayed anti-cd40l antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7464-7469
167. Schonbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P. Inhibition of cd40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7458-7463
168. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 1991;251:788-791
169. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997;100:2680-2690
170. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The yin and yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831-842
171. Aikawa M, Voglic SJ, Sugiyama S, Rabkin E, Taubman MB, Fallon JT, Libby P. Dietary lipid lowering reduces tissue factor expression in rabbit atheroma. *Circulation.* 1999;100:1215-1222
172. Hakkinen T, Karkola K, Yla-Herttuala S. Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and t-cells express cd40 and cd40l in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and cd16 (fc gamma3). *Virchows Arch.* 2000;437:396-405
173. Ruedl C, Bachmann MF, Kopf M. The antigen dose determines t helper subset development by regulation of cd40 ligand. *Eur J Immunol.* 2000;30:2056-2064
174. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M, Daemen M. Cd40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:118-123
175. Omari KM, Chui R, Dorovini-Zis K. Induction of beta-chemokine secretion by human brain microvessel endothelial cells via cd40/cd40l interactions. *J Neuroimmunol.* 2004;146:203-208
176. Pluvinet R, Olivar R, Krupinski J, Herrero-Fresneda I, Luque A, Torras J, Cruzado JM, Grinyo JM, Sumoy L, Aran JM. Cd40: An upstream master switch for endothelial cell activation uncovered by rna-coupled transcriptional profiling. *Blood.* 2008;112:3624-3637
177. Thienel U, Loike J, Yellin MJ. Cd154 (cd40l) induces human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell Immunol.* 1999;198:87-95
178. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM. Cd154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol.* 2009;30:165-172

179. Horkko S, Binder CJ, Shaw PX, Chang MK, Silverman G, Palinski W, Witztum JL. Immunological responses to oxidized ldl. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1771-1779
180. Lutgens E, Daemen MJ. Cd40-cd40l interactions in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:27-32
181. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*. 1990;346:425-434
182. Xu F, Ji J, Li L, Chen R, Hu W. Activation of adventitial fibroblasts contributes to the early development of atherosclerosis: A novel hypothesis that complements the "response-to-injury hypothesis" and the "inflammation hypothesis". *Med Hypotheses*. 2007;69:908-912
183. Yellin MJ, Winikoff S, Fortune SM, Baum D, Crow MK, Lederman S, Chess L. Ligation of cd40 on fibroblasts induces cd54 (icam-1) and cd106 (vcam-1) up-regulation and il-6 production and proliferation. *J Leukoc Biol*. 1995;58:209-216
184. Reinders ME, Sho M, Robertson SW, Geehan CS, Briscoe DM. Proangiogenic function of cd40 ligand-cd40 interactions. *J Immunol*. 2003;171:1534-1541
185. Russo S, Bussolati B, Deambrosis I, Mariano F, Camussi G. Platelet-activating factor mediates cd40-dependent angiogenesis and endothelial-smooth muscle cell interaction. *J Immunol*. 2003;171:5489-5497
186. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: From vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008;54:24-38
187. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by t lymphocytes: A role for cd40 signaling in plaque rupture? *Circ Res*. 1997;81:448-454
188. Morton RH. The critical power and related whole-body bioenergetic models. *Eur J Appl Physiol*. 2006;96:339-354
189. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J*. 1990;11 Suppl E:3-19
190. Sukhova GK, Schonbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billingham RC, Libby P. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation*. 1999;99:2503-2509
191. Miller DL, Yaron R, Yellin MJ. Cd40l-cd40 interactions regulate endothelial cell surface tissue factor and thrombomodulin expression. *J Leukoc Biol*. 1998;63:373-379
192. Pradier O, Willems F, Abramowicz D, Schandene L, de Boer M, Thielemans K, Capel P, Goldman M. Cd40 engagement induces monocyte procoagulant activity through an interleukin-10 resistant pathway. *Eur J Immunol*. 1996;26:3048-3054
193. Zhou L, Stordeur P, de Lavareille A, Thielemans K, Capel P, Goldman M, Pradier O. Cd40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity. *Thromb Haemost*. 1998;79:1025-1028
194. Baxendale AJ, Dawson CW, Stewart SE, Mudaliar V, Reynolds G, Gordon J, Murray PG, Young LS, Eliopoulos AG. Constitutive activation of the cd40 pathway promotes cell transformation and neoplastic growth. *Oncogene*. 2005;24:7913-7923
195. Bussolati B, Russo S, Deambrosis I, Cantaluppi V, Volpe A, Ferrando U, Camussi G. Expression of cd154 on renal cell carcinomas and effect on cell proliferation, motility and platelet-activating factor synthesis. *Int J Cancer*. 2002;100:654-661
196. van den Oord JJ, Maes A, Stas M, Nuyts J, Battocchio S, Kasran A, Garmyn M, De Wever I, De Wolf-Peeters C. Cd40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1996;149:1953-1961

197. Challa A, Eliopoulos AG, Holder MJ, Burguete AS, Pound JD, Chamba A, Grafton G, Armitage RJ, Gregory CD, Martinez-Valdez H, Young L, Gordon J. Population depletion activates autonomous cd154-dependent survival in biopsylike burkitt lymphoma cells. *Blood*. 2002;99:3411-3418
198. Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Terry N, Reid PS, Ford RJ. A cd40 signalosome anchored in lipid rafts leads to constitutive activation of nf-kappab and autonomous cell growth in b cell lymphomas. *Immunity*. 2002;16:37-50
199. Hayward AR, Levy J, Facchetti F, Notarangelo L, Ochs HD, Etzioni A, Bonnefoy JY, Cosyns M, Weinberg A. Cholangiopathy and tumors of the pancreas, liver, and biliary tree in boys with x-linked immunodeficiency with hyper-igm. *J Immunol*. 1997;158:977-983
200. Cantwell M, Hua T, Pappas J, Kipps TJ. Acquired cd40-ligand deficiency in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 1997;3:984-989
201. Hock BD, McKenzie JL, Patton NW, Drayson M, Taylor K, Wakeman C, Kantarjian H, Giles F, Albitar M. Circulating levels and clinical significance of soluble cd40 in patients with hematologic malignancies. *Cancer*. 2006;106:2148-2157
202. Skibola CF, Nieters A, Bracci PM, Curry JD, Agana L, Skibola DR, Hubbard A, Becker N, Smith MT, Holly EA. A functional tnfrsf5 gene variant is associated with risk of lymphoma. *Blood*. 2008;111:4348-4354
203. Loskog AS, Eliopoulos AG. The janus faces of cd40 in cancer. *Semin Immunol*. 2009;21:301-307
204. Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJ, Walboomers JM. Loss of transporter protein, encoded by the tap-1 gene, is highly correlated with loss of hla expression in cervical carcinomas. *J Exp Med*. 1994;179:335-340
205. Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Xu J, Hardardottir F, Baron JL, Janeway CA, Jr., Flavell RA. Requirement for cd40 ligand in costimulation induction, t cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1996;273:1864-1867
206. Diehl L, den Boer AT, Schoenberger SP, van der Voort EI, Schumacher TN, Melief CJ, Offringa R, Toes RE. Cd40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic t-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med*. 1999;5:774-779
207. French RR, Chan HT, Tutt AL, Glennie MJ. Cd40 antibody evokes a cytotoxic t-cell response that eradicates lymphoma and bypasses t-cell help. *Nat Med*. 1999;5:548-553
208. Sotomayor EM, Borrello I, Tubb E, Rattis FM, Bien H, Lu Z, Fein S, Schoenberger S, Levitsky HI. Conversion of tumor-specific cd4+ t-cell tolerance to t-cell priming through in vivo ligation of cd40. *Nat Med*. 1999;5:780-787
209. Mackey MF, Gunn JR, Ting PP, Kikutani H, Dranoff G, Noelle RJ, Barth RJ, Jr. Protective immunity induced by tumor vaccines requires interaction between cd40 and its ligand, cd154. *Cancer Res*. 1997;57:2569-2574
210. Dzojic H, Loskog A, Totterman TH, Essand M. Adenovirus-mediated cd40 ligand therapy induces tumor cell apoptosis and systemic immunity in the tramp-c2 mouse prostate cancer model. *Prostate*. 2006;66:831-838
211. Kato K, Cantwell MJ, Sharma S, Kipps TJ. Gene transfer of cd40-ligand induces autologous immune recognition of chronic lymphocytic leukemia b cells. *J Clin Invest*. 1998;101:1133-1141

212. Kikuchi T, Crystal RG. Anti-tumor immunity induced by in vivo adenovirus vector-mediated expression of cd40 ligand in tumor cells. *Hum Gene Ther.* 1999;10:1375-1387
213. Loskog A, Bjorkland A, Brown MP, Korsgren O, Malmstrom PU, Totterman TH. Potent antitumor effects of cd154 transduced tumor cells in experimental bladder cancer. *J Urol.* 2001;166:1093-1097
214. Sun Y, Peng D, Lecanda J, Schmitz V, Barajas M, Qian C, Prieto J. In vivo gene transfer of cd40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther.* 2000;7:1467-1476
215. Ghamande S, Hylander BL, Oflazoglu E, Lele S, Fanslow W, Repasky EA. Recombinant cd40 ligand therapy has significant antitumor effects on cd40-positive ovarian tumor xenografts grown in scid mice and demonstrates an augmented effect with cisplatin. *Cancer Res.* 2001;61:7556-7562
216. Hirano A, Longo DL, Taub DD, Ferris DK, Young LS, Eliopoulos AG, Agathangelou A, Cullen N, Macartney J, Fanslow WC, Murphy WJ. Inhibition of human breast carcinoma growth by a soluble recombinant human cd40 ligand. *Blood.* 1999;93:2999-3007
217. von Leoprechting A, van der Bruggen P, Pahl HL, Aruffo A, Simon JC. Stimulation of cd40 on immunogenic human malignant melanomas augments their cytotoxic t lymphocyte-mediated lysis and induces apoptosis. *Cancer Res.* 1999;59:1287-1294
218. Afford SC, Ahmed-Choudhury J, Randhawa S, Russell C, Youster J, Crosby HA, Eliopoulos A, Hubscher SG, Young LS, Adams DH. Cd40 activation-induced, fas-dependent apoptosis and nf-kappab/ap-1 signaling in human intrahepatic biliary epithelial cells. *FASEB J.* 2001;15:2345-2354
219. Procko E, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Gaudet R. The mechanism of abc transporters: General lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *FASEB J.* 2009;23:1287-1302
220. Lou Y, Vitalis TZ, Basha G, Cai B, Chen SS, Choi KB, Jeffries AP, Elliott WM, Atkins D, Seliger B, Jefferies WA. Restoration of the expression of transporters associated with antigen processing in lung carcinoma increases tumor-specific immune responses and survival. *Cancer Res.* 2005;65:7926-7933
221. Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, Davies CC, Luesley DM, Blom AM, Rickinson AB, Young LS, Eliopoulos AG. Activation of cd40 in cervical carcinoma cells facilitates ctl responses and augments chemotherapy-induced apoptosis. *J Immunol.* 2005;174:41-50
222. Donepudi M, Quach DD, Mokyr MB. Signaling through cd40 enhances cytotoxic t lymphocyte generation by cd8+ t cells from mice bearing large tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 1999;48:153-164
223. Moschonas A, Kouraki M, Knox PG, Thymiakou E, Kardassis D, Eliopoulos AG. Cd40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in carcinomas via the coordinated action of nf-kappab and of nf-kappab-mediated de novo synthesis of irf-1. *Mol Cell Biol.* 2008;28:6208-6222
224. Akiyama T, Shimo Y, Yanai H, Qin J, Ohshima D, Maruyama Y, Asaumi Y, Kitazawa J, Takayanagi H, Penninger JM, Matsumoto M, Nitta T, Takahama Y, Inoue J. The tumor necrosis factor family receptors rank and cd40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance. *Immunity.* 2008;29:423-437

225. Barbe-Tuana FM, Klein D, Ichii H, Berman DM, Coffey L, Kenyon NS, Ricordi C, Pastori RL. Cd40-cd40 ligand interaction activates proinflammatory pathways in pancreatic islets. *Diabetes*. 2006;55:2437-2445
226. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant hla-dr expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet*. 1983;2:1115-1119
227. Jacobson EM, Huber AK, Akeno N, Sivak M, Li CW, Concepcion E, Ho K, Tomer Y. A cd40 kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: The role of cd40 tissue-specific expression. *Genes Immun*. 2007;8:205-214
228. Wagner DH, Jr., Vaitaitis G, Sanderson R, Poulin M, Dobbs C, Haskins K. Expression of cd40 identifies a unique pathogenic t cell population in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:3782-3787
229. Waid DM, Wagner RJ, Putnam A, Vaitaitis GM, Pennock ND, Calverley DC, Gottlieb P, Wagner DH, Jr. A unique t cell subset described as cd4locd40+ t cells (tcd40) in human type 1 diabetes. *Clin Immunol*. 2007;124:138-148
230. Jacobson EM, Tomer Y. The cd40, ctla-4, thyroglobulin, tsh receptor, and ptpn22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: Back to the future. *J Autoimmun*. 2007;28:85-98
231. Faure GC, Bensoussan-Lejzerowicz D, Bene MC, Aubert V, Leclere J. Coexpression of cd40 and class ii antigen hla-dr in graves' disease thyroid epithelial cells. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;84:212-215
232. Smith TJ, Sciaky D, Phipps RP, Jennings TA. Cd40 expression in human thyroid tissue: Evidence for involvement of multiple cell types in autoimmune and neoplastic diseases. *Thyroid*. 1999;9:749-755
233. Jacobson EM, Concepcion E, Oashi T, Tomer Y. A graves' disease-associated kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of cd40 gene translation: A case for translational pathophysiology. *Endocrinology*. 2005;146:2684-2691
234. Carayanniotis G, Masters SR, Noelle RJ. Suppression of murine thyroiditis via blockade of the cd40-cd40l interaction. *Immunology*. 1997;90:421-426
235. Peterson KE, Braley-Mullen H. Cd40l is necessary for the priming of effector cells for lymphocytic and granulomatous experimental autoimmune thyroiditis. *J Autoimmun*. 1999;12:1-12
236. Marino E, Grey ST. A new role for an old player: Do b cells unleash the self-reactive cd8+ t cell storm necessary for the development of type 1 diabetes? *J Autoimmun*. 2008;31:301-305
237. Marino E, Villanueva J, Walters S, Liuwantara D, Mackay F, Grey ST. Cd4(+)cd25(+) t-cells control autoimmunity in the absence of b-cells. *Diabetes*. 2009;58:1568-1577
238. Serreze DV, Fleming SA, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of t cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1998;161:3912-3918
239. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. *Autoimmunity*. 2008;41:11-18
240. Balasa B, Krah T, Patstone G, Lee J, Tisch R, McDevitt HO, Sarvetnick N. Cd40 ligand-cd40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1997;159:4620-4627
241. Nanji SA, Hancock WW, Luo B, Schur CD, Pawlick RL, Zhu LF, Anderson CC, Shapiro AM. Costimulation blockade of both inducible costimulator and cd40 ligand induces

- dominant tolerance to islet allografts and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the nod mouse. *Diabetes*. 2006;55:27-33
242. Beaudette-Zlatanova BC, Whalen B, Zipris D, Yagita H, Rozing J, Groen H, Benjamin CD, Hunig T, Drexhage HA, Ansari MJ, Leif J, Mordes JP, Greiner DL, Sayegh MH, Rossini AA. Costimulation and autoimmune diabetes in bb rats. *Am J Transplant*. 2006;6:894-902
 243. Klein D, Barbe-Tuana F, Pugliese A, Ichii H, Garza D, Gonzalez M, Molano RD, Ricordi C, Pastori RL. A functional cd40 receptor is expressed in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2005;48:268-276
 244. Baker RL, Wagner DH, Jr., Haskins K. Cd40 on nod cd4 t cells contributes to their activation and pathogenicity. *J Autoimmun*. 2008;31:385-392
 245. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683-747
 246. Issazadeh S, Navikas V, Schaub M, Sayegh M, Khoury S. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol*. 1998;161:1104-1112
 247. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJ, Claassen E. Cd40-cd40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:2499-2504
 248. Howard LM, Miga AJ, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Laman JD, Noelle RJ, Miller SD. Mechanisms of immunotherapeutic intervention by anti-cd40l (cd154) antibody in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 1999;103:281-290
 249. Howard LM, Miller SD. Autoimmune intervention by cd154 blockade prevents t cell retention and effector function in the target organ. *J Immunol*. 2001;166:1547-1553
 250. Samoilova EB, Horton JL, Zhang H, Chen Y. Cd40l blockade prevents autoimmune encephalomyelitis and hampers th1 but not th2 pathway of t cell differentiation. *J Mol Med*. 1997;75:603-608
 251. Tan J, Town T, Paris D, Placzek A, Parker T, Crawford F, Yu H, Humphrey J, Mullan M. Activation of microglial cells by the cd40 pathway: Relevance to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1999;97:77-85
 252. Becher B, Blain M, Antel JP. Cd40 engagement stimulates il-12 p70 production by human microglial cells: Basis for th1 polarization in the cns. *J Neuroimmunol*. 2000;102:44-50
 253. Ponomarev ED, Shriver LP, Dittel BN. Cd40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation. *J Immunol*. 2006;176:1402-1410
 254. Becher B, Durell BG, Miga AV, Hickey WF, Noelle RJ. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of cd40 within the central nervous system. *J Exp Med*. 2001;193:967-974
 255. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet*. 2009;41:824-828
 256. Cho JH. Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol*. 2008;14:338-347
 257. Danese S, Sans M, Scaldaferri F, Sgambato A, Rutella S, Cittadini A, Pique JM, Panes J, Katz JA, Gasbarrini A, Fiocchi C. Tnf-alpha blockade down-regulates the cd40/cd40l pathway in the mucosal microcirculation: A novel anti-inflammatory mechanism of infliximab in crohn's disease. *J Immunol*. 2006;176:2617-2624

258. Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2005;129:50-65
259. Liu Z, Geboes K, Colpaert S, Overbergh L, Mathieu C, Heremans H, de Boer M, Boon L, D'Haens G, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Prevention of experimental colitis in scid mice reconstituted with cd45rb^{high} cd4⁺ t cells by blocking the cd40-cd154 interactions. *J Immunol*. 2000;164:6005-6014
260. Stuber E, Strober W, Neurath M. Blocking the cd40l-cd40 interaction in vivo specifically prevents the priming of t helper 1 cells through the inhibition of interleukin 12 secretion. *J Exp Med*. 1996;183:693-698
261. Clegg CH, Rulffes JT, Haugen HS, Hoggatt IH, Aruffo A, Durham SK, Farr AG, Hollenbaugh D. Thymus dysfunction and chronic inflammatory disease in gp39 transgenic mice. *Int Immunol*. 1997;9:1111-1122
262. Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Schreiber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Safety and tolerability of antagonist anti-human cd40 mab ch5d12 in patients with moderate to severe crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005;22:111-122
263. Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2008;223:252-270
264. Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, Park SH, Kim HY. Effector function of type ii collagen-stimulated t cells from rheumatoid arthritis patients: Cross-talk between t cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2004;50:776-784
265. Min DJ, Cho ML, Lee SH, Min SY, Kim WU, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY. Augmented production of chemokines by the interaction of type ii collagen-reactive t cells with rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2004;50:1146-1155
266. Lee HY, Jeon HS, Song EK, Han MK, Park SI, Lee SI, Yun HJ, Kim JR, Kim JS, Lee YC, Kim SI, Kim HR, Choi JY, Kang I, Kim HY, Yoo WH. Cd40 ligation of rheumatoid synovial fibroblasts regulates rankl-mediated osteoclastogenesis: Evidence of nf-kappab-dependent, cd40-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2006;54:1747-1758
267. Harigai M, Hara M, Nakazawa S, Fukasawa C, Ohta S, Sugiura T, Inoue K, Kashiwazaki S. Ligation of cd40 induced tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: A novel mechanism of activation of synoviocytes. *J Rheumatol*. 1999;26:1035-1043
268. Kitagawa M, Mitsui H, Nakamura H, Yoshino S, Miyakawa S, Ochiai N, Onobori M, Suzuki H, Sumida T. Differential regulation of rheumatoid synovial cell interleukin-12 production by tumor necrosis factor alpha and cd40 signals. *Arthritis Rheum*. 1999;42:1917-1926
269. Liu MF, Chao SC, Wang CR, Lei HY. Expression of cd40 and cd40 ligand among cell populations within rheumatoid synovial compartment. *Autoimmunity*. 2001;34:107-113
270. MacDonald KP, Nishioka Y, Lipsky PE, Thomas R. Functional cd40 ligand is expressed by t cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 1997;100:2404-2414
271. Berner B, Wolf G, Hummel KM, Muller GA, Reuss-Borst MA. Increased expression of cd40 ligand (cd154) on cd4⁺ t cells as a marker of disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2000;59:190-195

272. Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for cd40. *Science*. 1993;261:1328-1330
273. Kyburz D, Carson DA, Corr M. The role of cd40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic k/bxn mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2571-2577
274. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP, Gianniny L, Korman BD, Padyukov L, Kurreeman FA, Chang M, Catanese JJ, Ding B, Wong S, van der Helm-van Mil AH, Neale BM, Coblyn J, Cui J, Tak PP, Wolbink GJ, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Criswell LA, Amos CI, Seldin MF, Kastner DL, Ardlie KG, Alfredsson L, Costenbader KH, Altshuler D, Huizinga TW, Shadick NA, Weinblatt ME, de Vries N, Worthington J, Seielstad M, Toes RE, Karlson EW, Begovich AB, Klareskog L, Gregersen PK, Daly MJ, Plenge RM. Common variants at cd40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2008;40:1216-1223
275. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity*. 2001;15:397-408
276. Desai-Mehta A, Lu L, Ramsey-Goldman R, Datta SK. Hyperexpression of cd40 ligand by b and t cells in human lupus and its role in pathogenic autoantibody production. *J Clin Invest*. 1996;97:2063-2073
277. Grammer AC, Slota R, Fischer R, Gur H, Girschick H, Yarboro C, Illei GG, Lipsky PE. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of cd154-cd40 interactions. *J Clin Invest*. 2003;112:1506-1520
278. Katsiari CG, Liossis SN, Souliotis VL, Dimopoulos AM, Manoussakis MN, Sfikakis PP. Aberrant expression of the costimulatory molecule cd40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol*. 2002;103:54-62
279. Koshy M, Berger D, Crow MK. Increased expression of cd40 ligand on systemic lupus erythematosus lymphocytes. *J Clin Invest*. 1996;98:826-837
280. Higuchi T, Aiba Y, Nomura T, Matsuda J, Mochida K, Suzuki M, Kikutani H, Honjo T, Nishioka K, Tsubata T. Cutting edge: Ectopic expression of cd40 ligand on b cells induces lupus-like autoimmune disease. *J Immunol*. 2002;168:9-12
281. Goules A, Tzioufas AG, Manousakis MN, Kirou KA, Crow MK, Routsias JG. Elevated levels of soluble cd40 ligand (scd40l) in serum of patients with systemic autoimmune diseases. *J Autoimmun*. 2006;26:165-171
282. Pyrovolaki K, Mavroudi I, Sidiropoulos P, Eliopoulos AG, Boumpas DT, Papadaki HA. Increased expression of cd40 on bone marrow cd34+ hematopoietic progenitor cells in patients with systemic lupus erythematosus: Contribution to fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum*. 2009;60:543-552
283. Early GS, Zhao W, Burns CM. Anti-cd40 ligand antibody treatment prevents the development of lupus-like nephritis in a subset of new zealand black x new zealand white mice. Response correlates with the absence of an anti-antibody response. *J Immunol*. 1996;157:3159-3164
284. Kalled SL, Cutler AH, Datta SK, Thomas DW. Anti-cd40 ligand antibody treatment of snf1 mice with established nephritis: Preservation of kidney function. *J Immunol*. 1998;160:2158-2165
285. Mohan C, Shi Y, Laman JD, Datta SK. Interaction between cd40 and its ligand gp39 in the development of murine lupus nephritis. *J Immunol*. 1995;154:1470-1480

286. Wang X, Huang W, Schiffer LE, Mihara M, Akkerman A, Hiromatsu K, Davidson A. Effects of anti-cd154 treatment on b cells in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2003;48:495-506
287. Gaffney PM, Langefeld CD, Graham RR, Ortmann WA, Williams AH, Rodine PR, Moser KL, Behrens TW. Fine-mapping chromosome 20 in 230 systemic lupus erythematosus sib pair and multiplex families: Evidence for genetic epistasis with chromosome 16q12. *Am J Hum Genet.* 2006;78:747-758
288. Peters AL, Plenge RM, Graham RR, Altshuler DM, Moser KL, Gaffney PM, Bishop GA. A novel polymorphism of the human cd40 receptor with enhanced function. *Blood.* 2008;112:1863-1871
289. Antoniadis C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The cd40/cd40 ligand system: Linking inflammation with atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:669-677
290. Varo N, de Lemos JA, Libby P, Morrow DA, Murphy SA, Nuzzo R, Gibson CM, Cannon CP, Braunwald E, Schonbeck U. Soluble cd40l: Risk prediction after acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108:1049-1052
291. Antoniadis C, Tousoulis D, Vasiliadou C, Stefanadi E, Marinou K, Stefanadis C. Genetic polymorphisms of platelet glycoprotein ia and the risk for premature myocardial infarction: Effects on the release of scd40l during the acute phase of premature myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:1959-1966
292. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L. Enhanced levels of soluble and membrane-bound cd40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of t lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation.* 1999;100:614-620
293. Garlachs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Herrmann M, Klinghammer L, Daniel WG, Schmeisser A. Patients with acute coronary syndromes express enhanced cd40 ligand/cd154 on platelets. *Heart.* 2001;86:649-655
294. Tousoulis D, Antoniadis C, Stefanadis C. Assessing inflammatory status in cardiovascular disease. *Heart.* 2007;93:1001-1007
295. Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and cd40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005;96:339-345
296. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble cd40l and cardiovascular risk in women. *Circulation.* 2001;104:2266-2268
297. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M, Ganz P, Libby P. Effect of atorvastatin on risk of recurrent cardiovascular events after an acute coronary syndrome associated with high soluble cd40 ligand in the myocardial ischemia reduction with aggressive cholesterol lowering (miracl) study. *Circulation.* 2004;110:386-391
298. Malarstig A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Soluble cd40l levels are regulated by the -3459 a>g polymorphism and predict myocardial infarction and the efficacy of antithrombotic treatment in non-st elevation acute coronary syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1667-1673
299. Bizzozero G. Su di un nuovo elemento morfologico del sangue dei mammiferi edella sua importanza nella trombosi e nella coagulazione. *L'Osservatore.* 1881;17:785-787
300. Bizzozero G. Ueber einen neuen formbestandtheil des blutes und dessen rolle bei der thrombose und der blutgerinnung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol.* 1882;90:261-332

301. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81:2844-2853
302. Shaklai M, Tavassoli M. Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: A membrane reorganization process. *J Ultrastruct Res*. 1978;62:270-285
303. Yamada E. The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen. *Acta Anat (Basel)*. 1957;29:267-290
304. Djaldetti M, Fishman P, Bessler H, Notti I. Sem observations on the mechanism of platelet release from megakaryocytes. *Thromb Haemost*. 1979;42:611-620
305. Ihzumi T, Hattori A, Sanada M, Muto M. Megakaryocyte and platelet formation: A scanning electron microscope study in mouse spleen. *Arch Histol Jpn*. 1977;40:305-320
306. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation. *Am J Anat*. 1976;145:183-205
307. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: A misnomer? *Blood*. 1982;60:213-219
308. George JN. Platelets. *Lancet*. 2000;355:1531-1539
309. Michelson A. *Platelets*. San Diego: Academic Press; 2002.
310. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: The platelet paradigm. *Blood*. 1998;91:2645-2657
311. Boyles J, Fox JE, Phillips DR, Stenberg PE. Organization of the cytoskeleton in resting, discoid platelets: Preservation of actin filaments by a modified fixation that prevents osmium damage. *J Cell Biol*. 1985;101:1463-1472
312. Fox JE, Boyles JK, Berndt MC, Steffen PK, Anderson LK. Identification of a membrane skeleton in platelets. *J Cell Biol*. 1988;106:1525-1538
313. Kenney DM, Linck RW. The cytoskeleton of unstimulated blood platelets: Structure and composition of the isolated marginal microtubular band. *J Cell Sci*. 1985;78:1-22
314. Fox JE, Phillips DR. Inhibition of actin polymerization in blood platelets by cytochalasins. *Nature*. 1981;292:650-652
315. Hartwig JH. Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol*. 1992;118:1421-1442
316. Arai M, Yamamoto N, Moroi M, Akamatsu N, Fukutake K, Tanoue K. Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein vi have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br J Haematol*. 1995;89:124-130
317. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein vi that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest*. 1989;84:1440-1445
318. Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H. A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1987;69:1712-1720
319. Phillips DR, Agin PP. Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977;75:940-947
320. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. The platelet collagen receptor glycoprotein vi is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to fcalphar and the natural killer receptors. *J Biol Chem*. 1999;274:29019-29024

321. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein vi is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 1997;413:255-259
322. Niedergang F, Alcover A, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Francischetti IM, Bon C, Leduc M. Convulxin binding to platelet receptor gpvi: Competition with collagen related peptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273:246-250
323. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, Clemetson KJ. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a c-type lectin from crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/gpvi collagen receptor. *J Biol Chem.* 1997;272:13576-13583
324. Suzuki-Inoue K, Tulasne D, Shen Y, Bori-Sanz T, Inoue O, Jung SM, Moroi M, Andrews RK, Berndt MC, Watson SP. Association of fyn and lyn with the proline-rich domain of glycoprotein vi regulates intracellular signaling. *J Biol Chem.* 2002;277:21561-21566
325. Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J. The contribution of glycoprotein vi to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood.* 2003;102:1701-1707
326. Nieswandt B, Schulte V, Bergmeier W, Mokhtari-Nejad R, Rackebrandt K, Cazenave JP, Ohlmann P, Gachet C, Zirngibl H. Long-term antithrombotic protection by in vivo depletion of platelet glycoprotein vi in mice. *J Exp Med.* 2001;193:459-469
327. Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, Farndale RW, Heemskerk JW. Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood.* 2004;103:1333-1341
328. Moroi M, Okuma M, Jung SM. Platelet adhesion to collagen-coated wells: Analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1137:1-9
329. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein ia. *Nature.* 1985;318:470-472
330. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986;46:913-920
331. Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santoro SA. The membrane glycoprotein ia-iiia (vla-2) complex mediates the mg⁺⁺-dependent adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol.* 1989;108:1917-1924
332. Emsley J, King SL, Bergelson JM, Liddington RC. Crystal structure of the i domain from integrin alpha2beta1. *J Biol Chem.* 1997;272:28512-28517
333. Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 2000;101:47-56
334. Santoro SA, Rajpara SM, Staatz WD, Woods VL, Jr. Isolation and characterization of a platelet surface collagen binding complex related to vla-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153:217-223
335. Berndt MC, Shen Y, Dopheide SM, Gardiner EE, Andrews RK. The vascular biology of the glycoprotein ib-ix-v complex. *Thromb Haemost.* 2001;86:178-188
336. Jarvis GE, Atkinson BT, Snell DC, Watson SP. Distinct roles of gpvi and integrin alpha(2)beta(1) in platelet shape change and aggregation induced by different collagens. *Br J Pharmacol.* 2002;137:107-117

337. Berndt MC, Gregory C, Kabral A, Zola H, Fournier D, Castaldi PA. Purification and preliminary characterization of the glycoprotein ib complex in the human platelet membrane. *Eur J Biochem.* 1985;151:637-649
338. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von willebrand factor to platelets: Additional evidence in support of gpib as a platelet receptor for von willebrand factor. *Blood.* 1983;61:99-110
339. Modderman PW, Admiraal LG, Sonnenberg A, von dem Borne AE. Glycoproteins v and ib-ix form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J Biol Chem.* 1992;267:364-369
340. Lopez JA. The platelet glycoprotein ib-ix complex. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5:97-119
341. Andrews RK, Fox JE. Identification of a region in the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein ib-ix complex that binds to purified actin-binding protein. *J Biol Chem.* 1992;267:18605-18611
342. Andrews RK, Munday AD, Mitchell CA, Berndt MC. Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein ib-ix-v complex. *Blood.* 2001;98:681-687
343. Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein ib alpha. *J Biol Chem.* 1996;271:7362-7367
344. De Marco L, Mazzucato M, Masotti A, Ruggeri ZM. Localization and characterization of an alpha-thrombin-binding site on platelet glycoprotein ib alpha. *J Biol Chem.* 1994;269:6478-6484
345. Harmon JT, Jamieson GA. Thrombin binds to a high-affinity approximately 900 000-dalton site on human platelets. *Biochemistry.* 1985;24:58-64
346. Harmon JT, Jamieson GA. The glycosialicin portion of platelet glycoprotein ib expresses both high and moderate affinity receptor sites for thrombin. A soluble radioreceptor assay for the interaction of thrombin with platelets. *J Biol Chem.* 1986;261:13224-13229
347. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA. Platelet glycoprotein ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin mac-1 (cd11b/cd18). *J Exp Med.* 2000;192:193-204
348. Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein ib-ix-v complex is a platelet counterreceptor for p-selectin. *J Exp Med.* 1999;190:803-814
349. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan RE. Analysis of gpiib/iiia receptor number by quantification of 7e3 binding to human platelets. *Blood.* 1996;88:907-914
350. Woods VL, Jr., Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein iib-iiia complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem.* 1986;261:15242-15251
351. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein iib-iiia complex. *Blood.* 1988;71:831-843
352. Smyth SS, Joneckis CC, Parise LV. Regulation of vascular integrins. *Blood.* 1993;81:2827-2843
353. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000;28:311-339

354. Bork P, Doerks T, Springer TA, Snel B. Domains in plexins: Links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:261-263
355. Du X, Gu M, Weisel JW, Nagaswami C, Bennett JS, Bowditch R, Ginsberg MH. Long range propagation of conformational changes in integrin alpha iib beta 3. *J Biol Chem.* 1993;268:23087-23092
356. Frelinger AL, 3rd, Du XP, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha iib beta 3 (glycoprotein iib-iiia) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem.* 1991;266:17106-17111
357. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, Honda S, Shiraga M, Mizutani H, Handa M, Kurata Y, Matsuzawa Y, Shattil SJ. A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the beta3 subunit activates integrins alphaiibbeta3 and alphavbeta3. *Blood.* 1999;93:2559-2568
358. Wippler J, Kouns WC, Schlaeger EJ, Kuhn H, Hadvary P, Steiner B. The integrin alpha iib-beta 3, platelet glycoprotein iib-iiia, can form a functionally active heterodimer complex without the cysteine-rich repeats of the beta 3 subunit. *J Biol Chem.* 1994;269:8754-8761
359. Fox JE. Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:175-185
360. Fox JE, Lipfert L, Clark EA, Reynolds CC, Austin CD, Brugge JS. On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of gp iib-iiia, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras gtpase-activating protein with the membrane skeleton. *J Biol Chem.* 1993;268:25973-25984
361. Fox JE, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Packham MA, Sanan DA. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between alphaiibbeta3 and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem.* 1996;271:7004-7011
362. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R, et al. Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell.* 1991;67:233
363. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, Bainton DF. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and p-selectin (gmp-140). *Blood.* 1992;80:143-152
364. Norcott JP, Solari R, Cutler DF. Targeting of p-selectin to two regulated secretory organelles in pc12 cells. *J Cell Biol.* 1996;134:1229-1240
365. Yeo EL, Sheppard JA, Feuerstein IA. Role of p-selectin and leukocyte activation in polymorphonuclear cell adhesion to surface adherent activated platelets under physiologic shear conditions (an injury vessel wall model). *Blood.* 1994;83:2498-2507
366. Yuan Y, Kulkarni S, Ulsemer P, Cranmer SL, Yap CL, Nesbitt WS, Harper I, Mistry N, Dopheide SM, Hughan SC, Williamson D, de la Salle C, Salem HH, Lanza F, Jackson SP. The von willebrand factor-glycoprotein ib/v/ix interaction induces actin polymerization and cytoskeletal reorganization in rolling platelets and glycoprotein ib/v/ix-transfected cells. *J Biol Chem.* 1999;274:36241-36251
367. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9121-9126
368. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem.* 1984;259:9799-9804

369. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 1994;84:2068-2101
370. Dunlop LC, Skinner MP, Bendall LJ, Favalaro EJ, Castaldi PA, Gorman JJ, Gamble JR, Vadas MA, Berndt MC. Characterization of gmp-140 (p-selectin) as a circulating plasma protein. *J Exp Med*. 1992;175:1147-1150
371. Green SA, Setiadi H, McEver RP, Kelly RB. The cytoplasmic domain of p-selectin contains a sorting determinant that mediates rapid degradation in lysosomes. *J Cell Biol*. 1994;124:435-448
372. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. Gmp-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in weibel-palade bodies. *J Clin Invest*. 1989;84:92-99
373. Subramaniam M, Koedam JA, Wagner DD. Divergent fates of p- and e-selectins after their expression on the plasma membrane. *Mol Biol Cell*. 1993;4:791-801
374. Kansas GS. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood*. 1996;88:3259-3287
375. McEver RP, Cummings RD. Role of psgl-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest*. 1997;100:S97-103
376. Moore KL. Structure and function of p-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*. 1998;29:1-15
377. Bienvenu JG, Tanguay JF, Theoret JF, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation*. 2001;103:1128-1134
378. Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor p-selectin. *Trends Mol Med*. 2004;10:179-186
379. Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: Bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*. 2002;105:2130-2132
380. Nash GB. Adhesion between neutrophils and platelets: A modulator of thrombotic and inflammatory events? *Thromb Res*. 1994;74 Suppl 1:S3-11
381. Tanguay JF, Geoffroy P, Sirois MG, Libersan D, Kumar A, Schaub RG, Merhi Y. Prevention of in-stent restenosis via reduction of thrombo-inflammatory reactions with recombinant p-selectin glycoprotein ligand-1. *Thromb Haemost*. 2004;91:1186-1193
382. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol*. 2004;93:855-863
383. Giesberts AN, van Willigen G, Lapetina EG, Akkerman JW. Regulation of platelet glycoprotein iib/iii_a (integrin alpha iib beta 3) function via the thrombin receptor. *Biochem J*. 1995;309 (Pt 2):613-620
384. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein iib-iii_a. *Cardiovasc Res*. 2000;45:437-446
385. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29:91-105
386. Enjyoji K, Seigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS, 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner DD, Robson SC, Rosenberg RD. Targeted disruption of cd39/atp diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat Med*. 1999;5:1010-1017
387. Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood*. 1998;91:1318-1324

388. Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-selectin glycoprotein ligand 1 (psgl-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*. 2000;191:1413-1422
389. Miyata S, Goto S, Federici AB, Ware J, Ruggeri ZM. Conformational changes in the a1 domain of von willebrand factor modulating the interaction with platelet glycoprotein ibalpha. *J Biol Chem*. 1996;271:9046-9053
390. Ruf A, Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21:119-122
391. Siedlecki CA, Lestini BJ, Kottke-Marchant KK, Eppell SJ, Wilson DL, Marchant RE. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von willebrand factor. *Blood*. 1996;88:2939-2950
392. Ware JA, Heistad DD. Seminars in medicine of the beth israel hospital, boston. Platelet-endothelium interactions. *N Engl J Med*. 1993;328:628-635
393. Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ. Platelet adhesion to collagen types i through viii under conditions of stasis and flow is mediated by gpia/ia (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood*. 1994;83:1244-1250
394. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657-666
395. Ginsberg MH, Du X, Plow EF. Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 1992;4:766-771
396. Shattil SJ. Function and regulation of the beta 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost*. 1995;74:149-155
397. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:403-412
398. Sixma JJ, Slot JW, Geuze HJ. Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. *Methods Enzymol*. 1989;169:301-311
399. Baumgartner HR, Born GV. Effects of 5-hydroxytryptamine on platelet aggregation. *Nature*. 1968;218:137-141
400. Costa JL, Reese TS, Murphy DL. Serotonin storage in platelets: Estimation of storage-packet size. *Science*. 1974;183:537-538
401. Behnke O. Degrading and non-degrading pathways in fluid-phase (non-adsorptive) endocytosis in human blood platelets. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1992;24:169-178
402. Menard M, Meyers KM, Prieur DJ. Demonstration of secondary lysosomes in bovine megakaryocytes and platelets using acid phosphatase cytochemistry with cerium as a trapping agent. *Thromb Haemost*. 1990;63:127-132
403. Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:314-320
404. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J*. 2000;14:1265-1278
405. Carty DJ, Spielberg F, Gear AR. Thrombin causes subsecond changes in protein phosphorylation of platelets. *Blood*. 1986;67:1738-1743
406. Chung SH, Polgar J, Reed GL. Protein kinase c phosphorylation of syntaxin 4 in thrombin-activated human platelets. *J Biol Chem*. 2000;275:25286-25291
407. Elzagallaai A, Rose SD, Trifaro JM. Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of marcks: A marcks-derived peptide

- blocks marks phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation. *Blood*. 2000;95:894-902
408. Reed GL, Hough AK, Fitzgerald ML. Human platelets contain snare proteins and a sec1p homologue that interacts with syntaxin 4 and is phosphorylated after thrombin activation: Implications for platelet secretion. *Blood*. 1999;93:2617-2626
 409. Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, Varrichio AM, Shorr RG, Haslam RJ, Harley CB. Molecular cloning and expression of the major protein kinase c substrate of platelets. *Nature*. 1988;333:470-473
 410. Bernstein AM, Whiteheart SW. Identification of a cellubrevin/vesicle associated membrane protein 3 homologue in human platelets. *Blood*. 1999;93:571-579
 411. Chen D, Lemons PP, Schraw T, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Role of snap-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. *Blood*. 2000;96:1782-1788
 412. Lemons PP, Chen D, Whiteheart SW. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: Requirements for alpha-granule release. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267:875-880
 413. Polgar J, Reed GL. A critical role for n-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (nsf) in platelet granule secretion. *Blood*. 1999;94:1313-1318
 414. Parise LV. Integrin alpha(iiib)beta(3) signaling in platelet adhesion and aggregation. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11:597-601
 415. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993;361:315-325
 416. Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Yanagi S, Yamamura H, Okuma M. Cyclic amp-insensitive activation of c-src and syk protein-tyrosine kinases through platelet membrane glycoprotein vi. *J Biol Chem*. 1995;270:28029-28036
 417. Keely PJ, Parise LV. The alpha2beta1 integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase cgamma2 in platelets. *J Biol Chem*. 1996;271:26668-26676
 418. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alpha iib beta3 signalling and platelet function. *Nature*. 1999;401:808-811
 419. Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alpha iib beta3. *J Cell Biol*. 1998;141:1685-1695
 420. Clark EA, Shattil SJ, Ginsberg MH, Bolen J, Brugge JS. Regulation of the protein tyrosine kinase pp72syk by platelet agonists and the integrin alpha iib beta 3. *J Biol Chem*. 1994;269:28859-28864
 421. Lipfert L, Haimovich B, Schaller MD, Cobb BS, Parsons JT, Brugge JS. Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125fak in platelets. *J Cell Biol*. 1992;119:905-912
 422. Gao J, Zoller KE, Ginsberg MH, Brugge JS, Shattil SJ. Regulation of the pp72syk protein tyrosine kinase by platelet integrin alpha iib beta 3. *EMBO J*. 1997;16:6414-6425
 423. Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH, Brugge JS. Tyrosine phosphorylation of pp125fak in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem*. 1994;269:14738-14745
 424. Miranti CK, Leng L, Maschberger P, Brugge JS, Shattil SJ. Identification of a novel integrin signaling pathway involving the kinase syk and the guanine nucleotide exchange factor vav1. *Curr Biol*. 1998;8:1289-1299

425. Shattil SJ. Signaling through platelet integrin α IIb β 3: Inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost.* 1999;82:318-325
426. Oberfell A, Judd BA, del Pozo MA, Schwartz MA, Koretzky GA, Shattil SJ. The molecular adapter slp-76 relays signals from platelet integrin α IIb β 3 to the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2001;276:5916-5923
427. Jenkins AL, Nannizzi-Alaimo L, Silver D, Sellers JR, Ginsberg MH, Law DA, Phillips DR. Tyrosine phosphorylation of the β 3 cytoplasmic domain mediates integrin-cytoskeletal interactions. *J Biol Chem.* 1998;273:13878-13885
428. Theilmeyer G, Michiels C, Spaepen E, Vreys I, Collen D, Vermeylen J, Hoylaerts MF. Endothelial von willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood.* 2002;99:4486-4493
429. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002;196:887-896
430. Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, Gawaz M. Platelet adhesion via glycoprotein IIb/IIIa integrin is critical for atheroprotection and focal cerebral ischemia: An in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb/IIIa. *Circulation.* 2005;112:1180-1188
431. Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med.* 2003;9:61-67
432. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:3378-3384
433. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2000;148:75-85
434. Kaplanski G, Farnier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood.* 1994;84:4242-4248
435. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in *ccr2*^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature.* 1998;394:894-897
436. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:601-608
437. Ross R, Bowen-Pope DF, Raines EW. Platelets, macrophages, endothelium, and growth factors. Their effects upon cells and their possible roles in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;454:254-260
438. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: Partners in crime. *Circ Res.* 2005;96:612-616
439. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C. Rantes deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 2001;103:1772-1777
440. Gutstein DE, Fuster V. Pathophysiology and clinical significance of atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res.* 1999;41:323-333

441. Zhou J, Chew M, Ravn HB, Falk E. Plaque pathology and coronary thrombosis in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1999;230:3-11
442. Cooke JP, Wilson AM. Biomarkers of peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2017-2023
443. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;61:46-52
444. Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet.* 1998;352:1775-1777
445. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3:425-430
446. Hilgard P, Gordon-Smith EC. Microangiopathic haemolytic anaemia and experimental tumour-cell emboli. *Br J Haematol.* 1974;26:651-659
447. Jones IS, Flynn M, Hall B, Perrin L, Howland J. Laparoscopic assisted vaginal hysterectomy: An audit plus a word of caution. *J Obstet Gynaecol (Tokyo 1995).* 1995;21:119-125
448. Sindelar WF, Tralka TS, Ketcham AS. Electron microscopic observations on formation of pulmonary metastases. *J Surg Res.* 1975;18:137-161
449. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 1999;59:1295-1300
450. Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Jirouskova M, Degen JL. Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential by impeding natural killer cell-mediated elimination of tumor cells. *Blood.* 2005;105:178-185
451. Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Platelets as a source of growth-promoting factor(s) for tumor cells. *Cancer Res.* 1980;40:1212-1216
452. Nierodzik ML, Klepfish A, Karparkin S. Role of platelets, thrombin, integrin iib-iiia, fibronectin and von willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. *Thromb Haemost.* 1995;74:282-290
453. Falanga A, Ofosu FA, Delaini F, Oldani E, Dewar L, Lui L, Barbui T. The hypercoagulable state in cancer patients: Evidence for impaired thrombin inhibitions. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1994;5 Suppl 1:S19-23; discussion 59-64
454. Falanga A, Rickles FR. Pathophysiology of the thrombophilic state in the cancer patient. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25:173-182
455. Pearlstein E, Salk PL, Yogeewaran G, Karparkin S. Correlation between spontaneous metastatic potential, platelet-aggregating activity of cell surface extracts, and cell surface sialylation in 10 metastatic-variant derivatives of a rat renal sarcoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77:4336-4339
456. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. *Lancet.* 2006;367:1747-1757
457. Caro JJ, Huybrechts KF, Duchesne I. Management patterns and costs of acute ischemic stroke : An international study. For the stroke economic analysis group. *Stroke.* 2000;31:582-590
458. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: A review of population-based studies of incidence, prevalence, and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol.* 2003;2:43-53

459. Lewington S, Whitlock G, Clarke R, Sherliker P, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: A meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths. *Lancet*. 2007;370:1829-1839
460. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25:1847-1853; discussion 1853-1844
461. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: Novel insights and targets for treatment. *Blood*. 2008;112:3555-3562
462. Zeller JA, Tschoepe D, Kessler C. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb Haemost*. 1999;81:373-377
463. Iwamoto T, Kubo H, Takasaki M. Platelet activation in the cerebral circulation in different subtypes of ischemic stroke and binswanger's disease. *Stroke*. 1995;26:52-56
464. Steinman DA, Poepping TL, Tambasco M, Rankin RN, Holdsworth DW. Flow patterns at the stenosed carotid bifurcation: Effect of concentric versus eccentric stenosis. *Ann Biomed Eng*. 2000;28:415-423
465. Mondy JS, Lindner V, Miyashiro JK, Berk BC, Dean RH, Geary RL. Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo. *Circ Res*. 1997;81:320-327
466. Hughes M, Lip GY. Stroke and thromboembolism in atrial fibrillation: A systematic review of stroke risk factors, risk stratification schema and cost effectiveness data. *Thromb Haemost*. 2008;99:295-304
467. Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES, Jr., Kottirsch G, Pinsky DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting gp iib/iiia receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest*. 1998;102:1301-1310
468. Abumiya T, Fitridge R, Mazur C, Copeland BR, Koziol JA, Tschopp JF, Pierschbacher MD, del Zoppo GJ. Integrin alpha(iiib)beta(3) inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:1402-1409; discussion 1409-1410
469. Bergmeier W, Schulte V, Brockhoff G, Bier U, Zirngibl H, Nieswandt B. Flow cytometric detection of activated mouse integrin alphaiiibbeta3 with a novel monoclonal antibody. *Cytometry*. 2002;48:80-86
470. Kleinschnitz C, Pozgajova M, Pham M, Bendszus M, Nieswandt B, Stoll G. Targeting platelets in acute experimental stroke: Impact of glycoprotein ib, vi, and iib/iiia blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation*. 2007;115:2323-2330
471. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein vi for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*. 2003;197:41-49
472. Gruner S, Prostredna M, Schulte V, Krieg T, Eckes B, Brakebusch C, Nieswandt B. Multiple integrin-ligand interactions synergize in shear-resistant platelet adhesion at sites of arterial injury in vivo. *Blood*. 2003;102:4021-4027
473. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ. Cd40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res*. 2003;92:1041-1048

474. Choi WS, Jeon OH, Kim DS. Cd40 ligand shedding is regulated by interaction between matrix metalloproteinase-2 and platelet integrin $\alpha(\text{iib})\beta(3)$. *J Thromb Haemost.* 2010;8:1364-1371
475. Reinboldt S, Wenzel F, Rauch BH, Hohlfeld T, Grandoch M, Fischer JW, Weber AA. Preliminary evidence for a matrix metalloproteinase-2 (mmp-2)-dependent shedding of soluble cd40 ligand (scd40l) from activated platelets. *Platelets.* 2009;20:441-444
476. Choi WS, Jeon OH, Kim HH, Kim DS. Mmp-2 regulates human platelet activation by interacting with integrin $\alpha(\text{iib})\beta(3)$. *J Thromb Haemost.* 2008;6:517-523
477. Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of cd40 ligand (cd154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed cd40. *Blood.* 2001;98:1047-1054
478. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P. Deficiency or inhibition of gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nat Med.* 2001;7:215-221
479. Kowalska MA, Ratajczak MZ, Majka M, Jin J, Kunapuli S, Brass L, Poncz M. Stromal cell-derived factor-1 and macrophage-derived chemokine: 2 chemokines that activate platelets. *Blood.* 2000;96:50-57
480. Sawicki G, Salas E, Murat J, Miszta-Lane H, Radomski MW. Release of gelatinase a during platelet activation mediates aggregation. *Nature.* 1997;386:616-619
481. Gresele P, Falcinelli E, Momi S. Potentiation and priming of platelet activation: A potential target for antiplatelet therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29:352-360
482. Hostager BS, Hsing Y, Harms DE, Bishop GA. Different cd40-mediated signaling events require distinct cd40 structural features. *J Immunol.* 1996;157:1047-1053
483. Chen L, Daum G, Chitaley K, Coats SA, Bowen-Pope DF, Eigenthaler M, Thumati NR, Walter U, Clowes AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1403-1408
484. Wentworth JK, Pula G, Poole AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (vasp) is phosphorylated on ser157 by protein kinase c-dependent and -independent mechanisms in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem J.* 2006;393:555-564
485. Chitaley K, Chen L, Galler A, Walter U, Daum G, Clowes AW. Vasodilator-stimulated phosphoprotein is a substrate for protein kinase c. *FEBS Lett.* 2004;556:211-215
486. Xia M, Li G, Ma J, Ling W. Phosphoinositide 3-kinase mediates cd40 ligand-induced oxidative stress and endothelial dysfunction via rac1 and nadph oxidase 2. *J Thromb Haemost.* 2010;8:397-406
487. Ha YJ, Lee JR. Role of tnfr receptor-associated factor 3 in the cd40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol.* 2004;172:231-239
488. Adam F, Kauskot A, Rosa JP, Bryckaert M. Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:2007-2016
489. Mazharian A, Roger S, Maurice P, Berrou E, Popoff MR, Hoylaerts MF, Fauvel-Lafeve F, Bonnefoy A, Bryckaert M. Differential involvement of erk2 and p38 in platelet adhesion to collagen. *J Biol Chem.* 2005;280:26002-26010
490. Pula G, Poole AW. Critical roles for the actin cytoskeleton and cdc42 in regulating platelet integrin $\alpha(2)\beta(1)$. *Platelets.* 2008;19:199-210

491. Hathcock JJ. Flow effects on coagulation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1729-1737
492. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer--pfa-100. *Semin Thromb Hemost.* 1995;21 Suppl 2:106-112
493. Yago T, Lou J, Wu T, Yang J, Miner JJ, Coburn L, Lopez JA, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, McEver RP, Zhu C. Platelet glycoprotein I α forms catch bonds with human wt vwf but not with type 2b von willebrand disease vwf. *J Clin Invest.* 2008;118:3195-3207
494. Jackson SP, Nesbitt WS, Westein E. Dynamics of platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:17-20
495. Pamukcu B, Lip GY, Snezhitskiy V, Shantsila E. The cd40-cd40l system in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2011
496. Penno G, Pucci L, Dell'Omo G, Lucchesi D, Miccoli R, Del Prato S, Solini A, Pedrinelli R. Soluble cd40 ligand levels in essential hypertensive men: Evidence of a possible role of insulin resistance. *Am J Hypertens.* 2009;22:1007-1013
497. Lim HS, Blann AD, Lip GY. Soluble cd40 ligand, soluble p-selectin, interleukin-6, and tissue factor in diabetes mellitus: Relationships to cardiovascular disease and risk factor intervention. *Circulation.* 2004;109:2524-2528
498. Furie B. P-selectin and blood coagulation: It's not only about inflammation any more. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:877-878
499. Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1321-1324
500. Yacoub D HA, Theoret JF, Tabrizian M, Mourad W, Merhi Y. Cd40l primes platelets and enhances agonist-induced platelet activation and aggregation through a cd40-dependant taf2/rac1/p38 mapk signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010:Under review

Publications

Liste des publications 2005-2011

- 1- Abou-Saleh H, Théorêt JF, **Yacoub D**, Merhi Y. Neutrophil P-selectin-glycoprotein-ligand-1 binding to platelet P-selectin enhances metalloproteinase2 secretion and platelet-neutrophil aggregation. *Thromb Haemost.* 2005;94:1230-5.

- 2- Théorêt JF, Chahrour W, **Yacoub D**, Merhi Y. Recombinant P-selectin glycoprotein-ligand-1 delays thrombin-induced platelet aggregation: a new role for P-selectin in early aggregation. *Br J Pharmacol.* 2006;148:299-305.

- 3- **Yacoub D**, Théorêt JF, Villeneuve L, Abou-Saleh A, Mourad W, Allen BG, Merhi Y. Essential role of PKC delta in platelet signalling, $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation and thromboxane A2 release. *J Biol Chem.* 2006;281:30024-25.

- 4- Abou-Saleh H, **Yacoub D**, Théorêt JF, Gillis MA, Neagoe PE, Labarthe B, Thérout P, Sirois MG, Tabrizian M, Thorin E, Merhi Y. Endothelial Progenitor Cells Bind and Inhibit Platelet Function and Thrombus Formation. *Circulation.* 2009;120:2230-2239.

- 5- **Yacoub D**, Hachem A, Théorêt JF, Gillis MA, Mourad W, Merhi Y. Enhanced Levels of Soluble CD40L Exacerbate Platelet Aggregation and Thrombus Formation through a CD40-dependant TFAF2/Rac1/p38 MAPK Signaling Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010; 30:2424-2433.

- 6- Fatisson J, Mansouri S, **Yacoub D**, Merhi Y, Tabrizian M. Determination of surface-induced platelet activation by applying time-dependency dissipation factor versus frequency using quartz crystal microbalance with dissipation. *J R Soc Interface.* 2011; Feb 21. Epub ahead of print.